

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Juni 2001 (07.06.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
PCT WO 01/39881 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01J 20/32.** (74) Anwälte: **ZIEBIG, Marlene, K.** usw.; Patentanwälte
G01N 30/48 Gulde Hengelhaupt Ziebig, Schützenstrasse 15 - 17. 10117
Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/12095**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
1. Dezember 2000 (01.12.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
199 59 264.0 3. Dezember 1999 (03.12.1999) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **ELIPSA GMBH [DE/DE];** Köpenicker Strasse 325,
12555 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ULBRICHT, Mathias**
[DE/DE]; Landsberger Allee 89, 10407 Berlin (DE).
SERGEYEVA, Tatiana A. [UA/UA]; 14 Teremkovskaya
strasse, apt. 78, 03187 Kiev (UA). **MATUSCHEWSKI,**
Heike [DE/DE]; Galenusstrasse 6, 13187 Berlin (DE).
SCHEDLER, Uwe [DE/DE]; Torstrasse 12, 10119
Berlin (DE). **PILETSKY, Sergey A.** [UA/UA]; 21
Teremkovskaya strasse, 252107 Kiev (UA).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,**
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,**
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— Mit internationalem Recherchenbericht.
— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR PRODUCING TEMPLATE-TEXTURED MATERIALS WITH HIGH BINDING SPECIFICITY AND
SELECTIVITY AND UTILIZATION OF SAID MATERIALS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG TEMPLAT-GEPRÄGTER MATERIALIEN MIT HOHER
BINDUNGSSPEZIFITÄT UND SELEKTIVITÄT UND IHRE VERWENDUNG**

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of a template-textured material by synthesis of a template-textured polymer (TGP) by performing crosslinking polymerization of functional monomers on a carrier in the presence of a template. The invention is characterized in that a carrier having a thin polymer layer on the surface thereof is modified with a reaction mixture consisting of a polymerization initiator, a template, a functional monomer, a crosslinking agent, a solvent and/or a buffer. Polymerization is initiated after the reaction mixture has been absorbed in the thin polymer layer and continued until the absorption capacity of the thin polymer layer for the template-textured polymer (TGP) is achieved. The template is then optionally removed during a final step. The carrier used is selected in such a way that it cannot absorb the reaction solution. The materials disclosed in the invention are characterized by high binding specificity and selectivity for the template.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Templat-geprägten Materials durch Synthese eines Templat-geprägten Polymers (TGP) über vernetzende Polymerisation funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templates auf einem Träger, das dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Träger, der auf der Oberfläche eine dünne Polymerschicht aufweist, mit dem Reaktionsgemisch, bestehend aus Polymerisationsinitiator, Templat, funktionellem Monomer, Vernetzer, Lösungsmittel und/oder Puffer, versetzt wird, nach Sorption des Reaktionsgemisches in der dünnen Polymerschicht die Polymerisation gestartet und bis zum Erreichen der Aufnahmekapazität der dünnen Polymerschicht für das Templat-geprägte Polymer (TGP) geführt wird, und das Templat in einem letzten Schritt gegebenenfalls entfernt wird, wobei der eingesetzte Träger so gewählt wird, daß er die Reaktionslösung nicht aufnehmen kann. Die erfindungsgemäßen Materialien zeichnen sich durch hohe Bindungsspezifität und Selektivität für das Templat aus.

WO 01/39881 A1

5 **Verfahren zur Herstellung Templat-geprägter Materialien mit**
 hoher Bindungsspezifität und Selektivität und ihre
 Verwendung

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer
Templat-geprägter Materialien in Gestalt Templat-geprägter
Polymere (TGP) mit hoher Bindungsspezifität und Selektivität
auf einem festen Träger und ihre Verwendung für die
substanzspezifische Stofftrennung und -analytik.

15 In LifeSciences und Biotechnologie benötigt man für Substanzen wie Enzyme, monoklonale Antikörper, rekombinante Proteine oder kleinere Biomoleküle neue effiziente Trenn- und Reinigungsstrategien sowie Nachweisverfahren. Dies gilt auch für synthetische Wirkstoffe, insbesondere wenn sie eine komplexe Struktur oder/und ein höheres Molekulargewicht oder/und eine eingeschränkte Stabilität aufweisen.

20 Für alle diese Anwendungsgebiete werden substanzspezifische Hochleistungsmaterialien gesucht, wobei eine große Flexibilität in Anpassung an die speziellen Substanzen oder Wirkstoffe erforderlich ist. Vorzugsweise werden feste Materialien (Partikel, Filme, Gefäße, Filter, Membranen) eingesetzt, um die Phasentrennung von festen und flüssigen Stoffströmen zu vereinfachen. Im Unterschied zu Trennverfahren, die auf unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften beruhen, ist die chemische Affinität zum Träger
25 die Voraussetzung für substanzspezifische Trennungen. Substanzspezifität kann durch Wechselwirkungen zwischen biologischen oder biomimetischen Liganden und Rezeptoren erzielt werden. Für Affinitätstrennungen werden bislang entweder spezifische, aber sehr empfindliche biologische Liganden/Rezeptoren (z.B. Antikörper, Enzyme) oder relativ un-
30 spezifische synthetische Liganden (z.B. Farbstoffe, Metallchelate) verwendet; Beispiele sind Chromatographie, Festphasenextraktion, Membrantrennung, Festphasenassays oder Sensoren.

5 Porenfreie Filme, Schichten oder Partikel mit affinen Li-
ganden an der Oberfläche besitzen eine geringe spezifische
Oberfläche und damit beschränkte Bindungskapazität. Bei po-
rösen Materialien mit größerer spezifischer Oberfläche
treten typischerweise Einschränkungen der Bindungskapazität
10 durch Diffusionslimitierungen auf. Analoge Limitierungen
können in Packungen von Partikeln auftreten. Gerichtet
durchströmbare poröse Filter oder Membranen sind deshalb
besonders attraktive alternative Materialien. Etablierte
Membranverfahren mit porösen Membranen wie Mikro- oder Ul-
15 trafiltration funktionieren nach dem Größenausschlußprin-
zip. Die Trennung von Substanzen ähnlicher Molekülgröße mit
porösen Membranen erfordert zusätzlich spezifische (Af-
finitäts-) Wechselwirkungen mit der Membran.

20 Die Hauptmotivation für die Anwendung von Affinitätsmem-
branen besteht in der Möglichkeit der gerichteten Anströ-
mung trennspezifischer Gruppen (Liganden/Rezeptoren), die
sich in großer Dichte in den Poren befinden. Damit wird
eine drastische Verbesserung der Effektivität (geringerer
25 Druckabfall, kürzere Verweilzeiten, höhere Durchsatzge-
schwindigkeiten, kaum Diffusionslimitierung in Poren,
schnellere Equilibrierung) im Vergleich zu analogen Prozes-
sen mit Partikeln möglich. Solche Affinitätsmembranen kön-
nen für Stofftrennungen, z.B. Reinigung, vorzugsweise von
30 Proteinen, aber auch vieler anderer Substanzen (z.B. Pep-
tide, Nukleinsäurederivate, Kohlehydrate oder verschiedene
Toxine, Herbizide, Pestizide) bis zu Zellen genutzt werden.
Auch die Dekontamination von Stoffströmen ist ein Einsatz-
gebiet für diese Membranen mit vielen Anwendungen. Außerdem
35 ergeben sich für Affinitätsmembranen vielfältige Anwen-
dungsmöglichkeiten in der Analytik, wie z.B. zur hochse-
lektiven Probenanreicherung, z.B. durch Festphasenextrak-
tion), oder in Form einer quantitativen Bestimmung einer
Substanz auf einer Affinitätsmembran, z.B. mittels ELISA.

5 Eine sehr attraktive Alternative zu biologischen oder bio-
mimetischen Affinitäts-Liganden/Rezeptoren für Stoff-
trennung oder -analytik wurde in den letzten Jahren ent-
wickelt. Dies ist die Nutzung von spezifischen, aber sehr
robusten funktionellen Kavitäten ("molekularen Abdrücken")
10 in synthetischen Polymeren, hergestellt durch molekular
prägende Polymerisation (G. Wulff, Angew. Chem. 107, 1995,
1958; A.G. Mayes, K. Mosbach, Trends Anal. Chem. 16, 1997,
321; K. Haupt, K. Mosbach, Trends Biotechnol. 16, 1998,
468). Dazu realisiert man eine Polymerisation von Monomeren
15 in Gegenwart von Templatmolekülen (z.B. Protein, Nuklein-
säure, niedermolekulare organische Substanz), die mit einem
funktionellen Monomer einen während der Polymerisation re-
lativ stabilen Komplex bilden können. Nach dem Auswaschen
des Templates können die so hergestellten Materialien Tem-
20 platmoleküle wieder spezifisch binden. Die so synthe-
tisierten Polymere heißen Templat-geprägte (TGP) oder mole-
kular geprägte Polymere (s. Fig. 1).

Jede Substanz mit definierter dreidimensionaler Gestalt
25 kann als Templat für die Synthese von TGP genutzt werden.
Substanzklassen reichen folglich von kleinen Molekülen bis
zu Partikeln wie Viren, Bakterien oder Zellen. Verbindungen
mit biologischer Funktion wie Peptide, Nukleinsäuren oder
Kohlehydrate sind von besonders großem Interesse. Die Er-
30 kennung von Templaten durch TGP basiert auf der Kombination
verschiedener Faktoren wie reversibler kovalenter oder
nichtkovalenter Bindung, elektrostatischer und hydrophober
Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindung sowie der Kom-
plementarität der Gestalt. Welcher dieser Faktoren domi-
35 niert, ist von Templatstruktur und -eigenschaften, dem
funktionellen Monomer, der Polymerstruktur, sowie den Bin-
dungsbedingungen abhängig. Im Unterschied zum kovalenten
Ansatz zur TGP-Synthese, der aufwendige Synthesen von Tem-
plat/Monomer-Konjugaten erfordert, ist der nichtkovalente

5 Ansatz sehr viel flexibler. In hydrophoben Lösungsmitteln
sind elektrostatische Wechselwirkungen oft für die Templat-
erkennung durch TGP geeignet. Dagegen sind in polaren Lö-
sungsmitteln die Gestaltsspezifität sowie u.U. hydrophobe
10 Wechselwirkungen am wichtigsten für die Templaterkennung.
Vorzugsweise sollten TGP unter Bedingungen synthetisiert
werden, die starke, aber reversible Wechselwirkungen zwi-
schen dem Polymer und dem Templat favorisieren. Für große
Moleküle (ca. 200 - 1.000.000 Da) kann dagegen auch eine
15 Kombination von vielen schwächeren Bindungen unter Einbe-
ziehung von Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwir-
kungen günstig sein. Für kleine Moleküle (50 - 200 Da)
sind wenige starke Wechselwirkungen wie z.B. ionische Bin-
dungen notwendig, um TGP mit hoher Affinität zu erhalten.
Auf diese Weise sind z.B. die Herstellung polymerer Sorben-
20 tien in Gegenwart kleiner organischer Moleküle
(US 5,110,833) bzw. makromolekularer Substanzen
(US 5,372,719) oder die Synthese von Acrylamid- bzw.
Agarosegelen in Gegenwart von Proteinen beschrieben worden
(US 5,728,296, US 5,756,717). Über peptid- bzw. protein-
25 spezifische Sorbentien, hergestellt durch "Oberflächen-
prägen" von Metallchelatsstrukturen auf speziell funktio-
nalisierten Partikeln (US 5786428) oder von Kohlehydraten
in einer plasmapolymerisierten Schicht wurde ebenfalls be-
richtet. Auch TGP-Membranen durch ein spezielles Verfahren
30 zum "Oberflächenprägen" wurden beschrieben (WO 00/07702).
Eine signifikante Verbesserung der Synthese von TGPs aus
wässrigen Lösungen sowie für Anwendungen in wässrigen Systeme-
men wurde durch ein spezielles Verfahren zum "Oberflächen-
prägen" aus speziellen wässrigen Reaktionslösungen erzielt
35 (Patentanmeldung DE 19842641.1). In allen Fällen wurden
gute Affinitäten für die jeweiligen Template erhalten.

5 Die Anwendung von künstlichen Antikörpern und Rezeptoren, die durch molekulares Prägen hergestellt wurden, könnte sehr große Vorteile haben, weil diese Strukturen viel stabiler als ihre natürlichen Analoga sind. Außerdem können sie prinzipiell für jede Substanz (selbst für solche mit
10 wenig ausgeprägten Antigen-Eigenschaften, wie z.B. kleine Moleküle oder Immunodepressiva) synthetisiert sowie wesentlich einfacher und kostengünstiger als die entsprechenden Biomoleküle hergestellt werden.

15 Ein wesentliches Problem, das die Anwendungsmöglichkeiten von TGP noch immer deutlich einschränkt, besteht darin, daß neben der gewünschten, durch die TGP-Synthese erzielten Affinität der "molekularen Abdrücke" in großem Ausmaß auch noch unspezifische Wechselwirkungen auftreten. In den wenigen Beispielen, wo für TGP als "Plastik-Antikörper" in
20 Assays über eine bemerkenswerte Templatselektivität (relativ geringe "Kreuzreaktivität" gegenüber ähnlichen Substanzen) berichtet wird, werden nur sehr wenige Templatabdrücke im TGP und damit diejenigen mit der höchsten Affinität genutzt (K. Haupt, K. Mosbach, Trends Biotechnol. 16, 1998,
25 468). Generell, trotz der Spezifität der TGP für das Templat im Vergleich zu Kontrollpolymeren, die ohne Templat hergestellt wurden, binden auch letztere das Templat, wenn auch in geringerem Ausmaß. Die Selektivität der Bindung des
30 Templates im Vergleich zu strukturell ähnlichen oder verschiedenen anderen Substanzen ist folglich nur beschränkt.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, Templatgeprägte Materialien mit guter Affinität, hoher Bindungsspezifität und Selektivität für das Templat zu entwickeln
35 und ein Verfahren zur Herstellung dieser Materialien bereitzustellen.

5 Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren zur Herstellung eines Templat-geprägten Materials durch Synthese eines Templat-geprägten Polymers (TGP) durch die an sich bekannte vernetzende Polymerisation funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templats auf einem Träger gelöst, wobei
10 erfindungsgemäß ein Träger, der auf der Oberfläche eine dünne Polymerschicht aufweist, mit dem Reaktionsgemisch, bestehend aus Polymerisationsinitiator, Templat, funktionellem Monomer, Vernetzer, Lösungsmittel und/oder Puffer, versetzt wird, nach Sorption des Reaktionsgemisches in der
15 dünnen Polymerschicht die Polymerisation gestartet und bis zum Erreichen der Aufnahmekapazität der dünnen Polymerschicht für das Templat-geprägte Polymer (TGP) geführt wird, und das Templat in einem letzten Schritt gegebenenfalls entfernt wird, wobei der eingesetzte Träger so gewählt wird, daß er die Reaktionslösung nicht aufnehmen kann.

Erfindungsgemäß wird also ein Träger eingesetzt, der z.B. vorher mit einer dünnen Polymerschicht oberflächenmodifiziert wurde, die die unspezifische Bindung von Substanzen, z.B. dem Templat, minimiert. Es ist auch möglich,
25 daß während der Synthese des Trägers diese Polymerschicht aufgebracht und damit die erfindungsgemäße Zweischichtstruktur des Trägers erhalten wird.

30 Erfindungsgemäß können die eingesetzten Träger die zur Polymerisation benötigte Reaktionslösung nicht aufnehmen, während diese Reaktionslösung von der dünnen Polymerschicht auf dem Träger absorbiert wird und in dieser die Polymerisation stattfindet.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als Träger Formkörper aus einem hydrophoben Material eingesetzt, während die auf dem Träger befindliche dünne Polymerschicht hydrophiler Natur ist.

5 In dieser dünnen Polymerschicht wird die TGP-Synthese durch eine vernetzende Polymerisation der funktionellen Monomere in Gegenwart des Templates in wäßrigen oder organischen Reaktionslösungen zu stabilen Templatabdrücken initiiert und so diese dünne Polymerschicht als Matrix für die TGP-Synthese genutzt, wobei überraschenderweise eine bislang unerreichte Kombination von TGP-Spezifität und Selektivität mit minimaler unspezifischer Bindung erhalten wird. Anschließend können die synthetischen Rezeptorstrukturen in Form von Templatabdrücken Templatmoleküle oder Templatderivate aus organischen oder wäßrigen, salzhaltigen Lösungen hoch-spezifisch binden. Dadurch wird die Verwendung der TGP-Materialien für substanzspezifische Verfahren der Affinitätsstrennung und -analytik möglich.

20 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden als Träger stark vernetzte organische Polymere oder anorganische Festkörper eingesetzt, die weder eine hydrophile bzw. wässrige noch eine hydrophobe Reaktionslösung aufnehmen können, und wobei die auf dem Träger befindliche dünne Polymerschicht sowohl hydrophiler als auch hydrophober Natur sein kann.

30 Die erfindungsgemäßen neuartigen Templat-geprägten Materialien bestehen also aus TGP mit hoher Bindungsspezifität und Selektivität auf einem festen Träger. Durch eine vorherige zusätzliche Funktionalisierung oder Beschichtung dieses Trägers mit einer dünner Polymerschicht an der Oberfläche wird die unspezifische Bindung von mit Templat konkurrierenden Substanzen und Nicht-Templaten minimiert, gleichzeitig dient diese dünne Polymerschicht als Matrix für die synthetischen Rezeptorstrukturen (Templatabdrücke).

5 Erfindungsgemäß ist in an sich bekannter Weise die Integration der Beschichtung des Trägers mit einer dünnen Polymerschicht, die die unspezifische Bindung minimiert, mit der TGP-Synthese in dieser Polymerschicht auch in einem Verfahrensschritt möglich.

10 Vorzugsweise erfolgt aber die Herstellung der erfindungsgemäßen Templat-geprägten Materialien auf einem festen Träger variabler Gestalt (Film, Folie, Platte, Reaktionsgefäß, Partikel, Faser, Gewebe, Filter, Membran) mit einer dünnen Polymerschicht, die die unspezifische Bindung des Templat-
15 tes, von Templatderivaten sowie anderer Substanzen minimiert (s. Fig. 2). Die TPG-Synthese führt durch eine selektiv in der dünnen Polymerschicht initiierte, kontrollierte vernetzende Polymerisation in Gegenwart des Templates zu
20 kovalent und/oder durch Einschluß in der dünnen Polymerschicht ("Interpenetrating Network") fixierten TGPs mit Templatabdrukken an der gesamten äußeren Oberfläche des Formkörpers. Nur die funktionellen Gruppen von funktionellen Monomermolekülen, die während der Synthese mit Templat
25 komplexiert waren, sind an der äußeren Oberflächen des TGP-Materials fixiert und gut zugänglich. Ansonsten bestimmt die dünne Polymerschicht mit ihrem geringen unspezifischen Bindungsvermögen die äußere Oberfläche des TGP-Materials; bei ohne Templat synthetisierten Kontrollmaterialien ist es
30 nahezu ausschließlich diese dünne gering bindende Polymerschicht (vgl. Fig. 2). Aufgrund der Selektivität der Initiierung in der dünnen Polymerschicht, bleiben Matrixstruktur und Gestalt des Trägers intakt.

35 Besonders bevorzugt ist die Herstellung der erfindungsgemäßen Templat-geprägten Materialien auf festen Trägern variabler Gestalt, die durch eine Oberflächenmodifizierung mit einer dünnen Polymerschicht mit minimaler unspezifischer Bindung für das Templat, Templatderivate sowie andere Sub-

5 stanzen funktionalisiert sind. Somit kann eine unabhängige Optimierung von Gestalt bzw. Porenstruktur (Kapazität, Permeabilität) und Oberflächenfunktionalität (hohe Spezifität und Selektivität durch Templatabdrücke bei gleichzeitiger minimaler unspezifischer Bindung) erreicht werden. Die
10 Oberflächenfunktionalisierung von beispielsweise Nano-, Ultra- bzw. Mikrofiltrationsmembranen oder Filtern, bei der nach dem beschriebenen Herstellungsverfahren TGP-Membranen synthetisiert werden, ist dabei ganz besonders bevorzugt. Bei der Filtration durch oder der Applikation der erfindungsgemäßen Materialien können die Template oder Templat-
15 derivate auch aus verdünnten Lösungen in den Templatabdrücken mit hoher Spezifität gebunden werden. Dann können die Template oder Templatderivate ggf. gereinigt und anschließend entweder unter Filtrationsbedingungen (als Konzentrat) eluiert oder direkt auf dem Träger analytisch
20 nachgewiesen und quantifiziert werden.

Erfindungsgemäß werden als Template kleine Moleküle bis zu 100 Da (z.B. Triazinherbizide, chemische Wirkstoffe, Hormone oder Aminosäuren), größere Moleküle bis zu 1.000.000
25 Da (beispielsweise Peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder Kohlenhydrate) oder Partikel wie Viren, Bakterien oder Zellen eingesetzt. Besonders bevorzugt sind Template, die zu Wechselwirkungen via Ionenaustausch oder hydrophobe Bindung befähigt sind. Mit der vorliegenden Erfindung können auch
30 in wäßrigen Systemen ionische und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zur Synthese von TGP und somit zur molekularen Erkennung genutzt werden. Hydrophobe Wechselwirkungen können einen zusätzlichen Beitrag liefern. Dies ergibt insbesondere für kleine Moleküle
35 signifikante Verbesserungen und ist auch für biologisch relevante Moleküle wie z.B. Aminosäuren, Peptide, Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder Mono- und Oligosaccharide, aber auch für Proteine, DNA und RNA oder Polysaccharide

5 bzw. deren Konjugate nutzbar. Die Templatkonzentrationen in der Reaktionsmischung für die Herstellung der erfindungsgemäßen Materialien betragen zwischen 0.01 und 50 %.

10 Als funktionelle Monomere werden erfindungsgemäß polymerisationsfähige Verbindungen mit zur Wechselwirkung mit Templat-
15 platen befähigten Gruppen, insbesondere Carboxyl-, Sulfonyl-, Sulfat-, Phosphat-, Amino- oder quartären Ammonium-Gruppen sowie deren Derivate, auch im Gemisch, eingesetzt. Monomere mit positiv oder negativ geladenen funktionellen
20 Gruppen (z.B. aminofunktionelle Acrylat-, Methacrylat- oder Styrenderivate oder Acrylsäure, Methacrylsäure, 2-Acryloyl-amino-propan-2-sulfonsäure, Vinylsulfonsäure, Styrensulfonsäure bzw. Vinylphosphonsäure) sind für die erfindungsgemäße Herstellung von TGP-Materialien geeignet. Zusätzlich
25 können hydrophobe Einheiten wie z.B. aromatische Ringe, Kryptanden oder Cyclodextrine via spezielle Monomere in TGP eingebaut werden. Zur Komplexbildung befähigte Monomere wie Metallchelatkomplexe, Schiff'sche Basen und spezielle Ester können ebenfalls genutzt werden. Auch Anilin und Anilin-
30 derivate mit weiteren funktionellen Gruppen können für die erfindungsgemäße Herstellung von TGP-Materialien genutzt werden. Weiterhin sind z.B. auch Derivate der Phenyl-boronsäure, die mit Diolen Ester bilden können, als funktionelle Monomere geeignet. Letztlich können auch die funktionellen
35 Gruppen in einem Oligomer (z.B. Oligoethylenimin) oder Polymer (z.B. Agarose oder Polyethylenimin) durch Vernetzung im Sinne eines funktionellen Monomers genutzt werden. Die Konzentration funktioneller Monomere in der Reaktionsmischung für die TGP-Synthese kann zwischen 0.01 und 99.99% betragen.

Es ist bekannt, daß die Auswahl der Komponenten für ein Templat-spezifisches TGP vor allem aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Templat und funktionellem Monomer (Bil-

5 dung eines supramolekularen Komplexes) erfolgt. Studium und
Quantifizierung der Wechselwirkungen zwischen Templat und
funktionellen Monomeren, der Komplexbildung, sind z.B. mit
UV-Vis- oder NMR-Spektroskopie möglich. Mit dem Ziel, diese
Wechselwirkungen möglichst effektiv und für Affinitätswech-
10 selwirkungen zugänglich zu "fixieren", werden zusätzlich
geeignete Vernetzer, Lösungsmittel und Initiatoren gewählt.

Beispiele für Vernetzer sind Ethylenglycol-, Diethylen-
glycol-, Triethylenglycol-, oder Tetraethylenglycolbis-
15 methacrylat bzw. weitere analoge Derivate für funktionelle
Acrylate, N,N-Methylenbisacrylamid oder Piperazin-
bisacrylamid für funktionelle Acrylamide bzw. Methacryl-
amide, o-Phenylendiamin für funktionelle Anilinderivate,
oder Bisepoxide für Agarose. Die Vernetzerkonzentrationen
20 in der Monomermischung betragen zwischen 0 und 90%.

Die Lösungsmittel für die Polymerherstellung können das
Monomer selbst, Wasser, wässrige Pufferlösungen, organische
Lösungsmittel oder deren Mischungen sein. Generell hängt
25 der optimale Monomertyp natürlich von der Templatstruktur
sowie den Polymerisationsbedingungen ab.

Als Polymerisationsinitiator sind Verbindungen geeignet,
die (wie z.B. Peroxide, Azoverbindungen) nach Anregung ent-
30 weder unter Bindungsspaltung oder die (wie z.B. H-Abstrak-
toren) durch bimolekulare Reaktion mit anderen Molekülen /
Strukturen Radikale erzeugen, die eine Polymerisation star-
ten können. Besonders geeignet sind Photoinitiatoren, wie
z.B. Benzophenon und -derivate. In Abhängigkeit von den Po-
35 lymerisationsbedingungen sowie der Zusammensetzung können
die geprägten Polymere in der gewünschten Dichte, Porosi-
tät, Vernetzungsdichte und Konsistenz hergestellt werden.
Diese Vorgehensweise ist dem Fachmann bekannt.

5 Eine Vielzahl verschiedener Trägerformen wie Filme, Folien,
Platten, Reaktionsgefäße, Mikrotiterplatten, (Mikro- und
Nano-) Partikel, Fasern, Hohlfasern, Gewebe, Vliese, Filter
oder Membranen aus unterschiedlichen organischen oder anor-
ganischen Materialien kann für die erfindungsgemäße Her-
10 stellung Templat-geprägter Materialien verwendet werden.
Organische Materialien sind Polymere wie z.B. Polypropylen,
Polyethylen, Polystyren, Polysulfon, Polyamide, Polyester,
Polycarbonat, Polyacrylnitril, Polyvinylidenfluorid, Poly-
15 tetrafluoroethylen, Polyacrylate, Polyacrylamide, Cellu-
lose, Amylose, Agarose sowie deren Derivate, Copolymere
oder Blends. Anorganische Materialien sind z.B. Gläser, Si-
likate, Keramiken oder Metalle bzw. deren Komposite, auch
mit organischen Polymeren. Die Träger können porenfrei oder
poröse sein. Besonders bevorzugt im Hinblick auf Herstel-
20 lung und Verwendung der neuen templat-geprägten Materialien
sind Träger in Form polymerer Membranen, die durch Verfah-
ren wie Fällungsmittel- oder Temperatur-induzierte Phasen-
inversion in einer Vielzahl von Porenstrukturen sowie mit
den gewünschten mechanischen etc. Eigenschaften hergestellt
25 werden können. Die Membranen weisen vorzugsweise symmetri-
sche, aber auch asymmetrische Porenstrukturen und Poren-
größen zwischen wenigen nm und 10 μm , bevorzugt 100 nm bis
5 μm auf. Damit ist eine Auswahl optimaler poröser Matrix-
membranen (Träger) für die gewünschten Trenn- oder Analy-
30 senprozesse möglich. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt
sind aber Membranen (Träger) mit einer dünnen Polymer-
schicht auf der Oberfläche. Diese sind entweder kommerziell
verfügbar (z.B. hydrophylisierte PVDF-Membranen) oder nach
prinzipiell bekannten Verfahren herstellbar (z.B.
35 US 4,618,533).

Die erfindungsgemäße Herstellung der Templat-geprägten Ma-
terialien erfolgt mit einem Reaktionsgemisch, das zumindest
Templat und funktionelles Monomer enthält. Die Reaktion

5 verläuft unter Erhalt des Komplexes aus Templat und funktionellem Monomer, womit die fundamentale Voraussetzung für die Bildung von synthetischen Rezeptoren (Templatabdrücken) gegeben ist. Stabilität als auch die Porenstruktur des Trägers werden erfindungsgemäß nicht beeinträchtigt.

10 Durch die Wahl der Polymerschicht auf dem Träger können neben einer hohen Affinität der Templatabdrücke auch die unspezifischen Wechselwirkungen von strukturell ähnlichen oder verschiedenen Substanzen mit dem TGP minimiert werden.
15 Damit werden sowohl die Spezifität des TGP im Vergleich zur Kontrolle als auch die Selektivität des TGP für das Templat im Vergleich zu anderen Substanzen signifikant erhöht (vgl. Fig. 2).

20 Folgendes Herstellungsverfahren ist für die Synthese der erfindungsgemäßen TGP-Materialien mit hoher Bindungsspezifität und Selektivität besonders geeignet:

- 25 1. a) Auswahl eines Trägers mit einer dünnen Polymerschicht an der Oberfläche, die die unspezifische Bindung von Substanzen, z.B. Templat, am Träger minimiert, oder
b) Herstellung eines Trägers (während der Synthese bzw. der Verarbeitung des Trägermaterials oder durch Oberflächenmodifizierung des Trägers) mit einer dünnen Polymerschicht an der Oberfläche, die unspezifische Bindung
30 von Substanzen, z.B. Templat, am Träger minimiert,
2. Beschichtung des Trägers mit der Hauptmenge des Polymerisationsinitiators - Anreicherung des Initiators in der dünnen Polymerschicht,
- 35 3. Beschichtung des Trägers mit dem Reaktionsgemisch (Templat, Funktionelles Monomer, Vernetzer, Lösungsmittel und/oder Puffer, Restmenge an Initiator) - Sorption in der dünnen Polymerschicht,

- 5 4. Initierung der Polymerisation und Führung bis zum Erreichen der Aufnahmekapazität der dünnen Polymerschicht - bevorzugte Erzeugung von Startradikalen und Polymerisation in der dünnen Polymerschicht,
- 10 5. gegebenenfalls Extraktion von unumgesetzten Reaktanden, löslichem Homopolymer und Templat.

15 In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann der Polymerisationsinitiator im Schritt 2 auch vollständig gegeben werden.

20 Als Initiator wird eine Substanz eingesetzt, die nach physikalischer oder chemischer Anregung Radikale oder andere Starterspezies für eine Polymerisation erzeugt. Die Funktionalisierungen können auf der Wirkung der dünnen Polymerschicht als Coinitiator basieren, d.h. alle Polymere, aus denen sich durch Initiatoren Radikale oder andere Spezies generieren lassen, die eine Pfropfcopolymerisation starten können, lassen sich auf diese Weise modifizieren.

25 Eine photochemische Initiierung einer heterogenen Pfropfcopolymerisation (z.B. funktioneller Acrylate) ist zur erfindungsgemäßen Herstellung Templat-geprägter Materialien besonders bevorzugt. Dies erfolgt durch Verwendung eines

30 Photoinitiators, insbesondere vom H-Abstraktionstyp, sowie selektiver UV-Belichtung des Photoinitiators in Schritt 4. Dabei kann die Polymerisation bei für die TGP-Synthese besonders günstigen, niedrigen Temperaturen ($T \leq 25^{\circ}\text{C}$) stattfinden, wo der supramolekulare Komplex zwischen Templat und

35 funktionellem Monomer wenig gestört wird.

Auch eine gezielt initiierte chemische Pfropfung bzw. Vernetzung von Polymeren (z.B. Synthese von Polyanilinderivaten) auf dem Träger mit der dünnen Polymerschicht ist zur

5 erfindungsgemäßen Herstellung Templat-geprägter Materialien
geeignet. Auch die Synthese eines "Interpenetrating Net-
work", durch gezielt initiierte Polymerisation des TGP in
der dünnen Polymerschicht und Verankerung durch gegensei-
10 tige Durchdringung und/oder Verschlaufung ohne chemische
Reaktion zwischen beiden Polymeren, kann zu TGP mit hoher
Spezifität und Selektivität führen.

Es ist bekannt, daß die TGP-Synthesen durch Oberflächen-
funktionalisierung aus wäßrigen oder organischen Lösungs-
15 mitteln möglich sind. Über Initiierungs- und Polymerisati-
onsbedingungen lassen sich Funktionalisierungsgrad und da-
mit Oberflächenbedeckung des Trägers mit TGP steuern. Falls
erforderlich, kann so auch eine Blockierung der Trägerporen
minimiert werden. Durch die Vielzahl der Varianten ist die
20 Anwendung des für die TGP-Synthese etablierten Methoden-
arsenals auch auf die Oberflächenfunktionalisierung der
erfindungsgemäß eingesetzten speziellen Trägermaterialien
möglich.

25 Bei der Herstellung von TGP läßt sich durch den Zusatz von
Salz zur Reaktionslösung (in Schritt 3), z.B. als Puffer,
die Bindungsspezifität und -kapazität des Templat-geprägten
Polymers für das Templat sowie Templat-ähnliche Substanzen
erhöhen.

30 Um das Templat wieder aus dem TGP herauszuwaschen, können
z.B. eine Säure, die die elektrostatischen Wechselwirkungen
stört, eine Salzlösung mit einer zur Dissoziation ausrei-
chenden Ionenstärke oder ein Lösungsmittel mit anderer Po-
35 larität verwendet werden. Dadurch werden in den Poren
oder/und an der Oberfläche des erfindungsgemäßen Materials
die zur Templatstruktur komplementären Bindungsstellen wie-
der freigesetzt. Allerdings sind auch Anwendungen der er-
findungsgemäßen Materialien mit gebundenem Templat möglich.

5 Die Charakterisierung der Eigenschaften der erfindungsgemä-
ßen Materialien erfolgt in prinzipiell bekannter Weise mit
etablierten Verfahren, z.B. durch REM-Untersuchungen, Mes-
sungen der spezifischen Oberfläche (BET-Isotherme), FTIR-
ATR-Spektroskopie, Funktionalgruppenanalytik mit photome-
10 trischen oder fluorimetrischen Methoden, Kontakt-
winkelmessungen, sowie Permeabilitätsmessungen.

Die Charakterisierung der Eigenschaften der erfindungs-
gemäßen Materialien erfolgt in prinzipiell bekannter Weise
15 durch statische und dynamische Sorptionsexperimente mit dem
Templat oder anderen strukturell ähnlichen bzw. verschiede-
nen Substanzen. Insbesondere die Bindungskapazitäten der
erfindungsgemäßen Materialien für das Templat, in Abhängig-
keit von TGP-Struktur des Materials und den Testbedingungen
20 (Konzentration, Verweilzeit, applizierte Stoffmengen und
Volumen, Spülbedingungen; insbesondere auch in Mischungen
mit anderen Substanzen) sind wesentlich im Hinblick auf die
vielfältigen Anwendungen der erfindungsgemäßen Materialien.

25 Template oder Templatderivate werden bei der Applikation
auf oder der Filtration durch Templat-geprägte Materialien
der Erfindung, auch aus hoher Verdünnung, in den Templat-
abdrücken mit hoher Spezifität gebunden. Dann können die
Template oder Templatderivate durch Waschen gereinigt und
30 anschließend entweder direkt auf dem Träger nachgewiesen
oder unter Filtrationsbedingungen (als Konzentrat) eluiert
werden (s. Fig. 3). Mit den erfindungsgemäßen TGP-Mate-
rialien mit hoher Bindungsspezifität und Selektivität sind
also effektive substanz-spezifische Stofftrennungen
35 oder/und analytische Bestimmungen aus organischen oder wäß-
rigen Lösungen möglich.

5 Gegenstand der Erfindung sind auch die mit dem erfindungs-
gemäßen Verfahren hergestellten Templat-geprägten Mate-
rialien sowie deren Verwendung.

10 Die erfindungsgemäße Verwendung der neuartigen Templat-ge-
prägten Materialien liegt in der Stofftrennung und/oder
Analytik von flüssigen oder gasförmigen Stoffgemischen, die
auf der spezifischen Bindung der Template oder Templat-
derivate bei der Perfusion oder Diffusion durch Templat-ge-
15 prägte Polymere oder der Applikation auf Templat-geprägten
Polymeren basieren.

Folgende Anwendungen ergeben sich für die erfindungsgemäßen
TGP-Materialien, ohne daß damit die Anwendungsmöglichkeiten
auf die konkreten Fälle beschränkt werden sollen:

20 1. Trennung: Anwendung in Festphasenextraktion, Chromato-
graphie, Elektrophorese, Membrantrennung oder kontrol-
lierter Wirkstofffreisetzung - Filtration (Perfusion)
bzw. Affinitätsfiltration, Diffusion (Dialyse) oder
25 Elektrodifffusion (Elektrodialyse) von Lösungen oder gas-
förmige Gemischen durch die erfindungsgemäßen Templat-
geprägten Materialien bzw. Sorption an diese zur Aufkon-
zentrierung, Reinigung, Abtrennung oder anschließenden
analytischen Bestimmung von Substanzen,

30 2. Analytik: Anwendung als Teststreifen, Blottingmembran
oder sensitive Schicht für Assays in Reaktionsgefäßen
bzw. Mikrotiterplatten (z.B. qualitative oder quantita-
tive Bestimmungen oder Wirkstoffsuche/-screening) - Ap-
35 plikation von Lösungen oder gasförmigen Gemischen auf
TGP-Materialien oder Sorption an TGP-Materialien,

5 3. Sensorik: Anwendung als Rezeptor oder/und Transducer;
Anwendung zur, ggf. kontinuierlichen, analytischen Be-
stimmung von Substanzen,

10 4. Katalyse: Anwendung von TGP als Rezeptor und/oder kata-
lytisch aktives Zentrum; Anwendung zur Synthese, Reini-
gung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Sub-
stanzen.

15 Für o.g. Anwendungen reichen die geeigneten Substanzklassen
von kleinen Molekülen bis zu 100 Da (z.B. Triazinherbizide
oder Hormone) bis zu Partikeln wie Viren, Bakterien oder
Zellen. Insbesondere sind dies biologisch relevante Mole-
küle (Wirkstoffe) wie Aminosäuren, Peptide, Nukleinsäuren,
20 Oligonukleotide oder Mono- und Oligosaccharide, aber auch
für Proteine, DNA und RNA oder Polysaccharide bzw. deren
Konjugate.

25 Die erfindungsgemäßen Materialien haben den Vorteil, daß
sie durch eine Kombination von guter Affinität, hoher Spe-
zifität und Selektivität sowie geringer unspezifischer Bin-
dung neue hocheffektive Verfahren zur substanzspezifischen
Stofftrennung und -analytik ermöglichen. Insbesondere ist
auch die Herstellung der erfindungsgemäßen TGP-Materialien
aus wäßrigen Reaktionsmischungen möglich. Damit ist das er-
findungsgemäße Verfahren auch auf Biomoleküle unter Erhalt
30 ihrer Aktivität anwendbar. Damit können die neuen TGP-Mate-
rialien auch für die Stofftrennung und -analytik aus/in
wäßrigen Lösungen, und somit insbesondere in LifeScience
und Biotechnologie, angewendet werden.

35 Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen und Fi-
guren näher erläutert werden, ohne sie darauf einzuschrän-
ken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1. Für Terbumeton (2-t-Butylamino-4-ethyl-6-methoxy-1,3,5-triazin) templat-geprägte Polyvinylidenfluorid-Membranen

a) Variation des funktionellen Monomers

Runde Proben (4.9 cm^2) hydrophilierter PVDF-Membranen (Porengröße $0.22 \text{ }\mu\text{m}$; "hydrophilisierte Durapore"; Millipore GmbH, Eschborn) werden mit Aceton und Methanol extrahiert, getrocknet und gewogen. Danach werden sie für 5 min in eine 150 mM Lösung von BP (Photoinitiator) in Aceton getaucht und danach im Vakuum getrocknet. Anschließend werden die Membranen in Petrischalen mit der Reaktionslösung, bestehend aus 10 mM Terbumeton (Templat; PESTANAL; Riedel de Haën GmbH&CoKG, Seelze), 50 mM AA, MAA bzw. AMPS (funktionelles Monomer; Sigma-Aldrich), 300 mM MBAA (Vernetzer; Sigma-Aldrich) und 5 mM BP in Methanol, überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda > 310 \text{ nm}$) abgedeckt. Nach 10 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Belichtungszone). Anschließend werden die Membranen intensiv für 2 h im Soxhlet extrahiert, sowie mit Wasser, 50 mM Salzsäure, Wasser und wieder Methanol gewaschen. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad (DG, bezogen auf die äußere Membranoberfläche) bestimmt.

Präparationen unter o.g. Bedingungen werden auch mit nicht hydrophilierten PVDF-Membranen (Porengröße $0.22 \text{ }\mu\text{m}$; "hydrophobe Durapore"; Millipore GmbH, Eschborn) durchgeführt.

b) Variation der Konzentration des funktionellen Monomers

Die Präparation erfolgt wie oben beschrieben, jedoch mit Reaktionslösungen, bestehend aus 10 mM Terbumeton, 0 bis 60 mM AMPS, 300 mM MBAA und 5 mM BP in Methanol.

c) Variation der Konzentration des Vernetzers

Die Präparation erfolgt wie oben beschrieben, jedoch mit Reaktionslösungen, bestehend aus 10 mM Terbumeton, 50 mM AMPS, 200 bis 350 mM MBAA und 5 mM BP in Methanol.

Nicht templat-geprägte Kontrollproben werden jeweils nach analoger Vorschrift wie für die TGP-Membranen, aber ohne Templat, präpariert. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Modifizierungsgrade (DG, in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) für PVDF-Membranen nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne (Blank) das Templat Terbumeton (vgl. Beispiel 1)

	a) Funktionelles Monomer	AA	MAA	AMPS
hydrophilisierte	TGP1a	380	360	340
Durapore	Blank1a	320	310	340
hydrophobe	TGP1k	-	-	0
Durapore	Blank1k	-	-	0

b)					
Funktionelles Monomer AMPS	0 mM	20 mM	40 mM	50 mM	60 mM
1 TGP1b	350	370	380	340	410
Blank1b	380	400	380	340	420

c)							
Vernetzer MBAA	200 mM	225 mM	250 mM	275 mM	300 mM	325 mM	350 mM
2 TGP1c	350	300	310	370	340	340	360
Blank1c	390	350	360	360	340	330	320

5 Für TGP- und Blank-Materialien werden unter analogen Bedingungen jeweils ähnliche DG-Werte erhalten. Ein signifikanter Anstieg wird für TGP1b und Blank1b ab 60 mM AMPS beobachtet, was auf eine Modifizierung über die Kapazität der dünnen hydrophilen Polymerschicht hinaus hinweist (vgl. Fig. 2). Strukturuntersuchungen mit REM, BET, ATR-IR sowie Funktionalgruppenassays belegen die Modifizierung mit einer dünnen funktionellen Polyacrylatschicht; Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen TGP- und Blank-Materialien sind nicht nachweisbar.

15 **Beispiel 2.** Anwendung von für Terbumeton templat-geprägten Polyvinylidenfluorid-Membranen zur substanz-spezifischen Membran-Festphasenextraktion

20 Runde Proben (4.9 cm²) entsprechend Beispiel 1 modifizierter Membranen werden in einen Filterhalter aus Stahl mit Luer-Lock-Anschluß (effektive Membranfläche 3.8 cm²; Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) montiert. 10 ml einer 10⁻⁵ M Lösung des Herbizids (Terbumeton, Atrazin, Desmetryn oder Terbutylazin, Metribuzin; PESTANAL; Riedel de Haën GmbH&CoKG, Seelze) in Wasser werden aus einer Spritze mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min quantitativ durch die Membran filtriert. Anschließend werden sowohl das Filtrat als auch 10 ml der Rohlösung mit jeweils 10 ml Chloroform extrahiert. Die beiden Herbizidkonzentrationen werden dann mit Hilfe der Gaschromatographie (Trennsäule HP5MS; Hewlett Packard GC System HP 6890 mit Masse-selektivem Detektor HP 5973) quantitativ bestimmt; aus den Konzentrationen von Rohlösung und Filtrat wird die in der Membran gebundene Menge errechnet.

35 Zusammenfassungen der Ergebnisse geben Fig. 4 für die Variation des funktionellen Monomers (s. Beispiel 1a)),

Fig. 5 für die Variation der Konzentration des funktionellen Monomers (s. Beispiel 1b)) sowie Fig. 6 für die Variation der Konzentration des Vernetzers (s. Beispiel 1c)). Bei geringen Absolutwerten für die unspezifische Bindung ("Hintergrund"; $< 2 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) sind die Sorptionswerte für TGP- deutlich höher als für die entsprechenden Blank-Materialien; AMPS als das funktionelle Monomer mit der, im Vergleich zu AA und MAA, intensivsten Komplexbildung mit dem Templat ergibt TGP mit der höchsten Affinität (s. Fig. 4). Bei relativ geringen Absolutwerten für die unspezifische Bindung ("Hintergrund"; $< 5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) sind die Sorptionswerte für TGP- Materialien erst bei einer AMPS-Konzentration von 40 mM deutlich höher als die für die entsprechenden Blank-Materialien; zu hohe AMPS-Konzentrationen führen zu zu hohen DG-Werten (vgl. Tabelle 1b) und damit einem zu deutlichen Anstieg der unspezifischen Sorption (s. Fig. 5). Nur bei einer optimalen Vernetzerkonzentration werden mit dem funktionellen (Kationenaustauscher-) Monomer AMPS geringe Absolutwerte für die unspezifische Bindung ("Hintergrund"; $< 5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) sowie höhere Sorptionswerte für TGP- im Vergleich zu entsprechenden Blank-Materialien erhalten (s. Fig. 6).

Beispiel 3. Für Desmetryn (2-Isopropylamino-4-methylamino-6-methylthio-1,3,5-triazin) templat-geprägte Polyvinylidenfluorid-Membranen

Eine runde Probe (46 cm^2) einer hydrophilierten PVDF-Membran (vgl. Beispiel 1) wird mit Chloroform und Methanol extrahiert, getrocknet und gewogen. Danach wird die Membran für 30 min in eine 100 mM Lösung von BP in Methanol getaucht. Anschließend wird die Membran, deren Poren noch mit der BP-Lösung gefüllt sind, in einer Petrischale ($d = 10 \text{ cm}$) mit 20 ml Reaktionslösung, bestehend aus 10 mM Desmetryn (Templat), 50 mM AMPS (funktionelles Monomer),

5 100 mM MBAA (Vernetzer) und 0.1 mM BP in Wasser, überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda > 310$ nm) abgedeckt. Nach 30 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Be-

10 lichtungszone). Anschließend wird die Membran intensiv mit Methanol, Wasser, 50 mM Salzsäure, Wasser und wieder Methanol gewaschen. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad (DG, bezogen auf die äußere Membranoberfläche) bestimmt. Nicht templat-geprägte Kontrollproben

15 werden nach analoger Vorschrift, aber ohne Templat, präpariert. Ergebnisse für nach o.g. allgemeiner Vorschrift variierte Präparationsbedingungen zeigt Tabelle 2.

20 TGP- und Blank-Materialien lassen sich auch aus wäßrigen Lösungen synthetisieren, es werden unter analogen Bedingungen jeweils ähnliche DG-Werte erhalten.

Beispiel 4. Anwendung von für Desmetryn templat-geprägten Polyvinylidenfluorid-Membranen zur substanz-

25 spezifischen Membran-Festphasenextraktion

Runde Proben (4.9 cm^2) entsprechend Beispiel 3 modifizierter Membranen werden in einen Filterhalter aus Stahl mit Luer-Lock-Anschluß (effektive Membranfläche 3.8 cm^2 ; Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) montiert. 10 ml einer

30 10^{-5} M Lösung des Herbizids (Desmetryn) in Wasser bzw. 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 5.0) werden aus einer Spritze mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min quantitativ durch die Membran filtriert. Anschließend werden sowohl das

35 Filtrat als auch 10 ml der Rohlösung mit jeweils 10 ml Chloroform extrahiert. Die beiden Herbizidkonzentrationen werden dann mit Hilfe der Gaschromatographie (Trennsäule HP5MS; Hewlet Packard GC System HP 6890 mit Masse-selektivem Detektor HP 5973) quantitativ bestimmt; aus den Konzen-

5 trationen von Rohlösung und Filtrat wird die in der Membran gebundene Menge errechnet. Dabei werden die in Tabelle 2 dargestellten Werte für die Herbizidsorption erhalten.

10 Die Ergebnisse für die Bindung unterschiedlicher Herbizide (s. Fig. 7) zeigen eine bemerkenswerte, verglichen mit dem Stand der Technik unerwartete Substanzspezifität: Nur das TGP-Material zeigt eine signifikante Bindung für eine Triazinherbizid, und diese Bindung wird ausschließlich für das bei der Synthese verwendete Templat Terbumeton und
15 nicht für die strukturell sehr ähnlichen Triazinherbizide Metribuzin, Desmetryn, Atrazin und Terbutryn erhalten.

Bei geringen Absolutwerten für die unspezifische Bindung ("Hintergrund"; $< 5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) sind die Sorptionswerte für
20 TGP- deutlich höher als für die entsprechenden Blank-Materialien. Das gilt besonders auch für die durch pH- und Salz- Variation synthetisierten TGP-Materialien; letztere können dann das Templat auch aus Pufferlösungen spezifisch binden.

25 Das TGP-gebundene Herbizid kann durch pH-Wechsel oder erhöhte Salzkonzentration wieder aus der Membran eluiert werden. So werden von der Membran TGP 2/1 nach Sorption von Desmetryn aus Wasser (vgl. Tabelle 2) mit 10 ml einer 100 mM Lösung von Natriumchlorid in Wasser 89% wieder eluiert. In analoger Weise kann das Herbizid aus einer $1 \cdot 10^{-9}$ M Lösung bei einer Sorption von 100% sowie einer Wiederfindung von 90 % 1000fach angereichert werden; d.h. eine substanzspezifische Festphasenextraktion kann sowohl zur
30 Aufreinigung als auch zur Aufkonzentrierung genutzt werden. Die TGP-Membranen sind ohne Verlust an Spezifität und Kapazität nach einer einfachen Regeneration wiederholt einsetzbar.
35

Tabelle 2: Modifizierungsgrade (DG; vgl. Beispiel 3) sowie Desmetrynsorption (aus Wasser oder Puffer, pH = 5.0) bei der Filtration (vgl. Beispiel 4) für hydrophilierte PVDF-Membranen nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne (Blank) das Templat Desmetryn

PVDF-h		Reaktions- lösung: Salz (mM)	Funktio- nalisierung DG (µg/ cm²)	Sorption LM	n (µmol/cm²) /%
	ph				
TGP 2/1	1.5	1	305	Wasser	17.2/65.4
Blank 2/1	1.5	1	285	Wasser	2.0/7.6
TGP 2/1	1.5	1	305	Puffer	3.0/11.4
Blank 2/1	1.5	1	285	Puffer	3.2/12.2
TGP 2/2	1.5	50	310	Puffer	13.9/52.9
Blank 2/2	1.5	50	290	Puffer	4.2/16.0
TGP 2/3	2.1	50	320	Puffer	9.9/37.6
Blank 2/3	2.1	50	305	Puffer	3.8/14.4

Beispiel 5. Herstellung eines Polypropylen-Membran-Trägers mit einer dünnen hydrophilen vernetzten Polymerschicht (PP-h)

Eine PP-Membran (39 cm^2 ; Porengröße $0.2\text{ }\mu\text{m}$; Accurel PP 2E HF; Akzo-Nobel AG, Wuppertal) wird unter Schütteln für 2 h mit einer 100 mM Lösung von BP in Aceton equilibriert. Die Membran wird aus der Lösung entnommen, und nach Entfernung der außen anhaftenden Lösung sofort in einer Petrischale mit einer Reaktionslösung, bestehend aus 75 g/l 2-Hydroxypropyl methacrylat und 7.5 g/l Tetraethylenglycol bis-

5 methacrylat (jeweils Röhm GmbH, Darmstadt) in mit BP gesättigtem Wasser überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda > 310$ nm) abgedeckt. Nach 5 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Belichtungszone). Anschließend wird die Membran mit Wasser für 2 h im Soxhlet extrahiert und anschließend mit Aceton und Methanol gewaschen. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad bestimmt: DG (PP-h) = 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Mit der spezifischen Oberfläche des Membranmaterials (PP) von 17.5 m^2/g sowie unter Annahme einer Dichte des Pfropfpolymers von 1 g/cm^3 entspricht dieser DG-Wert einer Schichtdicke der hydrophilen, vernetzten Polymerschicht von ca. 10 nm.

20 Als spezielle Träger für die erfindungsgemäße TGP-Synthese können oberflächenmodifizierte Membranen mit einer dünnen Polymerschicht mit aufgrund der Hydrophilie niedriger unspezifischer Bindung hergestellt werden.

25 **Beispiel 6.** Für Terbumeton templat-geprägte Polypropylen-Membran und Verwendung für Membran-Festphasenextraktion

30 Eine entsprechend Beispiel 5 modifizierte PP-Membran (39 cm^2 ; PP-h) wird für 5 min in eine 150 mM Lösung von BP in Aceton getaucht und danach im Vakuum getrocknet. Anschließend wird die Membran in einer Petrischale mit der Reaktionslösung, bestehend aus 10 mM Terbumeton (Templat), 50 mM AMPS (funktionelles Monomer), 300 mM MBAA (Vernetzer) und 5 mM BP in Methanol, überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda > 310$ nm) abgedeckt. Nach 10 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Belichtungszone). Anschließend wird

5 die Membran intensiv für 2 h im Soxhlet extrahiert, sowie
mit Wasser, 50 mM Salzsäure, Wasser und wieder Methanol ge-
waschen. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der Modi-
fizierungsgrad bestimmt (s. Tabelle 3). Eine nicht templat-
geprägte Kontrollprobe wird nach analoger Vorschrift, aber
10 ohne Templat, präpariert. Nach der Funktions-
charakterisierung wie in Beispiel 2 beschrieben, werden die
in Tabelle 3 dargestellten Werte für die Herbizidsorption
erhalten.

15 Tabelle 3: Modifizierungsgrade (DG) sowie Terbumeton-
sorption aus Wasser bei der Filtration für
hydrophilierte PP-Membranen nach Synthesen
mit (TGP) bzw. ohne (Blank) das Templat Ter-
bumeton

PP-h	Funktionalisierung DG ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Sorption n ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) / %
TGP 3/1	345	11.1/42.2
Blank 3/1	325	2.1/8.0
PP, unmodifiziert	-	22.4/85.0

Bei geringen Absolutwerten für die unspezifische Bindung
("Hintergrund"; $< 3 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$; vgl. "PP, unmodifiziert"),
die auf die vorherige Beschichtung mit einer dünnen, ver-
netzen, hydrophilen Polymerschicht (vgl. Beispiel 5) zu-
rückzuführen ist, sind die Sorptionswerte für TGP- deutlich
25 höher als für die entsprechenden Blank-Materialien.

Beispiel 7. Für Desmetryn templat-geprägte Polypropylen-
Membranen und Verwendung für Membran-Festpha-
30 senextraktion

5 Eine entsprechend Beispiel 5 modifizierte PP-Membran
(39 cm²; PP-h) wird für 30 min in eine 100 mM Lösung von BP
in Methanol getaucht. Anschließend wird die Membran, deren
Poren noch mit der BP-Lösung gefüllt sind, in einer Petri-
schale (d = 10 cm) mit 20 ml Reaktionslösung, bestehend aus
10 10 mM Desmetryn (Templat), 50 mM AMPS (funktionelles Mono-
mer), 100 mM MBAA (Vernetzer) und 0.1 mM BP in Wasser,
überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte
(Tief-UV-Filter, $\lambda > 310$ nm) abgedeckt. Nach 30 min erfolgt
die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei
15 Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Be-
lichtungszone). Anschließend wird die Membran intensiv mit
Methanol, Wasser, 50 mM Salzsäure, Wasser und wieder Metha-
nol gewaschen. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der
Modifizierungsgrad bestimmt. Eine nicht templat-geprägte
20 Kontrollprobe wird nach analoger Vorschrift, aber ohne Tem-
plat, präpariert (s. Tabelle 4). Nach der Funktionscharak-
terisierung wie in Beispiel 4 beschrieben werden die in Ta-
belle 4 dargestellten Werte für die Herbizidsorption erhal-
ten.

25
Tabelle 4: Modifizierungsgrade (DG) sowie Desmetryn-
sorption aus Wasser bei der Filtration (vgl.
Beispiel 4) für hydrophilierte PP-Membranen
nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne (Blank)
30 das Templat Desmetryn

PP-h	Funktionalisierung DG ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Sorption n ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) / %
TGP 4/1	315	9.9/37.6
Blank 4/1	310	1.2/4.6
PP, unmodifiziert	-	11.6/44.0

Bei geringen Absolutwerten für die unspezifische Bindung ("Hintergrund"; $< 2 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$; vgl. "PP, unmodifiziert"), die auf die vorherige Beschichtung mit einer dünnen, vernetzen, hydrophilen Polymerschicht (vgl. Beispiel 5) zurückzuführen ist, sind auch nach Synthese aus wäßrigen Reaktionsmischungen die Sorptionswerte für TGP- deutlich höher als für die entsprechenden Blank-Materialien.

Die sehr hohe Spezifität der erfindungsgemäßen TGP-Materialien (bei Vergleich zu den Kontrollproben) sowie die sehr hohe Templat-Selektivität (im Verhältnis zu anderen, strukturell sehr ähnlichen Triazinherbiziden) sowie die Flexibilität des Syntheseverfahrens im Vergleich zum bisherigen Stand der Technik wird durch Tabelle 5 illustriert.

Tabelle 5: Vergleich der erfindungsgemäßen TGP-Materialien mit dem Stand der Technik (Synthese durch Oberflächenfunktionalisierung via Photopropfopolymerisation: funktionelles Monomer AMPS, Stöchiometrie relativ zu Templat 5:1, Vernetzer MBAA) in Bezug auf die Anwendung zur Membran-Festphasenextraktion (Selektivität: immer Vergleich zwischen Sorption für Terbumeton und Desmetryn)

Synthese			Membran-Festphasenextraktion		
	Templat	Lösungsmittel	unspez. Sorpt. n ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	Spezifität TGP/Blank	Selektivität Templat/Nicht-Templat
PP ^f	Desmetryn	Wasser	15.0	1.6	1.08
PVDF	Desmetryn	Wasser	Synthese nicht möglich		
PP-h ^a	Desmetryn	Wasser	1.2	8.2	n.b.
PVDF-h ^b	Desmetryn	Wasser	2.0	8.6	6.9
PP ^f	Terbumeton	MeOH	Synthese nicht möglich		
PVDF	Terbumeton	MeOH	Synthese nicht möglich		
PVDF-h ^c	Terbumeton	MeOH	2.1	5.3	n.b.
PVDF-h ^d	Terbumeton	MeOH	0.5	22.0	10.8

5 ^a TGP4; vgl. Beispiel 7; ^b TGP2; vgl. Beispiel 3; ^c TGP3;
vgl. Beispiel 6; ^d TGP1; vgl. Beispiele 1&2; # Synthese auf
Träger ohne dünne Polymerschicht (Stand der Technik)

10 **Beispiel 8.** Mit Polyanilin für Metribuzin (4-Amino-3-
Methylthio-6-tert.-Butylamino-1,2,4-triazin-
5-on) geprägte modifizierte Polypropylen-Mem-
bran und Verwendung für Membran-Festphasen-
extraktion

15 Eine entsprechend Beispiel 5 modifizierte PP-Membran
(25 cm²) wird in 10 ml einer 200 mM Lösung von Anilinhydro-
chlorid und 50 mM Metribuzin in Wasser eingebracht. Nach
10 min werden 10 ml einer 100 mM Lösung des Oxidations-
mittels Ammoniumperoxodisulfat zugegeben und für 15 min un-
20 ter Schütteln (300 rpm) zur Reaktion gebracht. Anschließend
wird die Membran intensiv mit 10 mM Salzsäure, Wasser und
Methanol gewaschen. Danach wird getrocknet und gravime-
trisch der Modifizierungsgrad bestimmt. Eine nicht templat-
geprägte Kontrollprobe wird nach analoger Vorschrift, aber
25 ohne Templat, präpariert (s. Tabelle 6). Nach der
Funktionscharakterisierung wie in Beispiel 2 beschrieben,
mit Metribuzin, werden die in Tabelle 6 dargestellten Werte
für die Herbizidsorption erhalten.

30 Als alternative Synthese für die erfindungsgemäßen TGP-Ma-
terialien eignet sich auch die chemische Initiierung einer
Pfropfung und Vernetzung eines funktionellen Polymers auf
einem speziellen Träger mit einer dünnen Polymerschicht.

35 Tabelle 6: Modifizierungsgrade (DG) sowie Metribuzin-
sorption aus Wasser bei der Filtration (vgl.
Beispiel 4) für hydrophilierte PP-Membranen
nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne (Blank)
das Templat Metribuzin

PP-h	Funktionalisierung DG ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Sorption n ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) / %
TGP 5/1	210	7.9/30.0
Blank 5/1	230	4.1/15.6

Beispiel 9. Modifizierung von Polypropylen-Mikrotiterplatten mit einer dünnen hydrophilen vernetzten Polymerschicht (PP-h)

In die Wells einer 96er-Mikrotiterplatte aus PP (flacher Boden; Corning Costar Germany, Bodenheim) werden je 100 μl einer 100 mM Lösung von BP in Aceton pipettiert, danach wird die Platte verschlossen. Nach 2 Stunden wird die Lösung herauspipettiert, die Wells werden für 10 Sekunden mit 120 μl einer 1 mM Lösung von BP in Aceton gespült und anschließend für 15 Minuten an der Luft getrocknet. Danach werden in die Wells jeweils 100 μl einer Reaktionslösung, bestehend aus 75 g/l 2-Hydroxypropyl methacrylat (Röhm) und 7.5 g/l Tetraethylenglycol bismethacrylat (Röhm) in mit BP gesättigtem Wasser pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda > 310 \text{ nm}$) abgedeckt. Nach 5 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Belichtungszone). Anschließend wird die Mikrotiterplatte zunächst mit heißem Wasser und anschließend mit Aceton und Methanol gewaschen.

Als spezielle Träger für die erfindungsgemäße TGP-Synthese können oberflächenmodifizierte Mikrotiterplatten mit einer dünnen Polymerschicht mit niedriger unspezifischer Bindung hergestellt werden.

5 **Beispiel 10.** Für Atrazin geprägte Mikrotiterplatte (MTP-TGP)

10 In die Wells einer nach Beispiel 9 modifizierten 96er-Mikrotiterplatte (PP-h) werden je 100 μ l einer 100 mM Lösung von BP in Aceton pipettiert, danach wird die Platte verschlossen. Nach 2 Stunden wird die Lösung herauspipettiert, die Wells werden für 10 Sekunden mit 120 μ l einer 1 mM Lösung von BP in Aceton gespült und anschließend für 15 Minuten an der Luft getrocknet. Danach werden in die Wells jeweils 100 μ l einer Reaktionslösung, bestehend aus 10 mM Atrazin (Templat), 50 mM AMPS (funktionelles Monomer), 300 mM MBAA (Vernetzer) und 5 mM BP in Methanol pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird dann mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda > 310$ nm) abgedeckt. Nach 30 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Belichtungszone). Anschließend wird die Mikrotiterplatte zunächst mit heißem Wasser, dann mit 50 mM Salzsäure, Wasser und Methanol gewaschen. Eine Kontrollpräparation (MTP-Blank) wird in analoger Weise, aber ohne Atrazin, hergestellt.

25 **Beispiel 11.** Ersatz von biologischen Rezeptoren (hier Anti-Atrazin-Antikörper) in Mikrotiterplatten-Assays durch TGP-Oberflächen

30 Die nach Beispiel 10 erhaltenen Oberflächen der Wells der Mikrotiterplatte aus PP (MTP-TGP) zeigen das Verhalten von künstlichen Antikörpern für Atrazin, was sich in einem kompetitiven Triazin-Assay nutzen läßt:

35 In unterschiedlichen TGP-Wells werden jeweils 50 μ l einer Lösung von Herbizid (Atrazin oder Metribuzin) in Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-4} M in Wasser sowie danach 50 μ l Atrazin-Peroxidase-Konjugate-Lösung (aus dem Pestanal Atrazin ELISA Kit; Riedel de Haen) pipettiert und unter Schütteln bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgen Waschen, Entwickeln sowie Stoppen nach der Vor-

schrift des kommerziellen Assays (vgl. o.). Die Extinktionen bei 450 nm werden in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen; als Kontrolle dienen Messungen in Wells, in denen ohne Templat modifiziert wurde (MTP-Blank) sowie die Bestimmungen mit einem anderen Herbizid (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse eines kompetitiven Assays für Atrazin unter Nutzung des Atrazin-Peroxidase-Konjugates sowie der Entwicklungslösungen (POD-Assay) eines kommerziellen Atrazin-ELISA-Kits mit Atrazin-geprägten (MTP-TGP) sowie Kontrollwells (MTP-Blank) einer PP-Mikrotiterplatte

Extinktion (450nm)				
Atrazinkonzentration	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
MTP-TGP	0.75	0.69	0.61	0.55
Metribuzinkonzentration (nM)	0.78	0.73	0,76	0.69
MTP-TGP	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
MTP-Blank	0.78	0.77	0.74	0.72

In einem Assay zur Analytik von Herbiziden im ELISA-Format und nach einem etablierten ELISA-Protokoll zeigen die neuen TGP-Materialien eine ausgeprägte Spezifität (TGP vs. Blank) und Selektivität (Templat Atrazin vs Nicht-Templat Metribuzin).

Beispiel 12. Für Peroxidase geprägte Mikrotiterplatte (MTP-TGP)

In den Wells einer nach Beispiel 9 modifizierten 96er-Mikrotiterplatte (PP-h) wird Anilin nach folgender Vorschrift polymerisiert: Zu 30 μ l einer Lösung von Anilinhydrochlorid (720 mM) und Meerrettichperoxidase (1.67 mg/ml) in Wasser werden 20 μ l Ammoniumperoxodisulfat (250 mM in Wasser)

5 pipettiert, gründlich vermischt und bei Raumtemperatur unter Schütteln für 2 h zur Reaktion gebracht. Danach wird gründlich mit Wasser und anschließend mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7.5) gewaschen. Eine Kontrollpräparation (MP-Blank) wird in analoger Weise, aber ohne
10 Peroxidase, hergestellt.

Beispiel 13. Ersatz von biologischen Rezeptoren (hier Anti-Peroxidase-Antikörper) in Mikrotiterplatten-Assays durch TGP-Oberflächen

15 Eine nach Beispiel 12 modifizierte Mikrotiterplatte zeigt das Verhalten von künstlichen Antikörpern für Peroxidase. Um die Affinität der TGP-Oberflächen für das Templat zu demonstrieren, wird Meerrettichperoxidase aus einer Lösung
20 einer Konzentration von 1 g/l unter Schütteln bei Raumtemperatur für 2 h adsorbiert. Danach wird mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7.5) gründlich gewaschen und dann mit Hilfe der Entwicklungslösungen aus dem Pestanal Atrazin-ELISA-Kit (Riedel de Haen) sowie nach den Vorschriften des
25 Kits die POD-Aktivität gemessen. Die signifikant höheren Extinktionswerte (450 nm) für die TGP-Oberfläche (MTP-TGP/POD: 0.27 ± 0.08) im Vergleich zur nicht geprägten Kontrollprobe (MTP-Blank/POD: 0.12 ± 0.06) zeigen die bevorzugte Bindung von Peroxidase an den synthetischen Rezeptorstrukturen.
30

Beispiel 14. Herstellung von Mikropartikel-Trägern mit einer dünnen hydrophilen vernetzten Polymer-
schicht (MP-h)

35 Zu einer Suspension (100 mg/ml; 10 ml) von Mikropartikeln (Durchmesser 3 μ m, Styren-MSA-Copolymer-Kern mit einer hydroxyfunktionellen Oberfläche; microcaps GmbH, Rostock) in Wasser werden unter intensivem Rühren 10 ml einer frisch

5 angesetzten Lösung aus 50 g/l 2-Hydroxypropyl methacrylat
und 5 g/l Tetraethylenglycol bismethacrylat in 0.08 M wäß-
riger Salpetersäure zugegeben, intensiv mit Stickstoff ge-
spült sowie auf 50°C erwärmt. Danach werden $4 \cdot 10^{-3}$ M
Cerammoniumnitrat zugegeben, und die Polymerisation wird
10 für 2 Stunden bei 50°C, unter Stickstoff sowie intensivem
Rühren durchgeführt. Danach werden 80 ml Wasser zugegeben;
dann wird zentrifugiert, mit Methanol gewaschen, in Wasser
resuspendiert und anschließend intensiv mit Wasser gewa-
schen (Dialyse gegen Wasser).

15 Als spezielle Träger für die erfindungsgemäße TGP-Synthese
können oberflächenmodifizierte Mikropartikel mit einer dün-
nen Polymerschicht mit aufgrund der Hydrophilie niedriger
unspezifischer Bindung hergestellt werden.

20 **Beispiel 15. Für Atrazin geprägte Mikropartikel (MP-TGP)**

Zu einer Suspension (100 mg/ml; 5 ml) von nach Beispiel 14
modifizierten Mikropartikeln in Methanol (MP-h) werden 5 ml
25 einer Reaktionslösung, bestehend aus 20 mM Atrazin (Tem-
plat), 100 mM AMPS (funktionelles Monomer), 600 mM MBAA
(Vernetzer) und 20 mM BP in Methanol zugegeben. Diese Sus-
pension wird in einer flachen Schale auf einem Rührtisch
plaziert, mit einer Glasplatte dicht abgedeckt, mit Stick-
stoff gespült und intensiv gerührt. Nach 30 min erfolgt die
30 Belichtung mit einer UV-Lampe (UVA-Spot 2000 mit Tief-UV-
Filter H2; Dr. Hönle GmbH, Planegg) für 15 min.. Danach
werden 40 ml Wasser zugegeben; dann wird zentrifugiert und
anschließend zunächst mit heißem Wasser, dann mit 50 mM
35 Salzsäure, Wasser und Methanol gewaschen (jeweils beendet
durch Zentrifugieren); danach wird resuspendiert und inten-
siv mit Wasser gewaschen (Dialyse). Eine Kontrollpräpara-
tion (MP-Blank) wird in analoger Weise, aber ohne Atrazin,
hergestellt.

5 **Beispiel 16.** Ersatz von biologischen Rezeptoren (hier
Anti-Atrazin-Antikörper) in Mikropartikel-
Assays durch TGP-Oberflächen

10 Die nach Beispiel 15 erhaltenen Oberflächen der Mikroparti-
kel (MP-TGP) zeigen das Verhalten von künstlichen Antikör-
pern für Atrazin, was sich in einem kompetitiven Triazin-
Assay nutzen läßt:

15 In Wells einer 96er MultiScreen-Filterplatte (PVDF-Membran;
Millipore GmbH, Eschborn) werden zu 200 µl der Mikro-
partikelsuspension (100 mg/ml) jeweils 50 µl einer Lösung
von Herbizid (Atrazin oder Metribuzin) einer Konzentratio-
nen von 10^{-5} M in Wasser sowie danach 50 µl Atrazin-Peroxi-
dase-Konjugate-Lösung (aus dem Pestanal Atrazin ELISA Kit;
20 Riedel de Haen) pipettiert und unter Schütteln bei Raumtem-
peratur für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgen Absaugen,
Waschen, Entwickeln sowie Stoppen nach der Vorschrift des
kommerziellen Assays (vgl. o.). Die Lösungen werden entnom-
men und die Extinktionen bei 450 nm in einem UV-Spektrome-
ter gemessen; als Kontrolle dienen Messungen mit Partikeln,
25 die ohne Templat modifiziert wurden (MTP-Blank) sowie die
Bestimmungen mit einem anderen Herbizid (s. Tabelle 8).

30 In einem Festphasenassay zur Analytik von Herbiziden im
ELISA-Format und nach einem etablierten ELISA-Protokoll
zeigen die neuen TGP-Materialien eine ausgeprägte Spezifi-
tät (TGP vs. Blank) und Selektivität (Templat Atrazin vs
Nicht-Templat Metribuzin).

35 Tabelle 8: Ergebnisse eines kompetitiven Assays für
Atrazin unter Nutzung des Atrazin-Peroxidase-
Konjugates sowie der Entwicklungslösungen (POD-
Assay) eines kommerziellen Atrazin-ELISA-Kits
mit Atrazin-geprägten (MP-TGP) sowie Kontroll-
(MP-Blank) Mikropartikeln

Extinktion (450 nm)		
Konzentration 10^{-5} nM	Atrazin	Metribuzin
MTP-TGP	0.75	0.81
MTP-Blank	0.86	0.85

5

Es zeigen die Figuren:

Fig. 1: Schematische Darstellung der Prinzipien für die
Synthese und Funktion von Templat-geprägten Polymeren (TGP) gemäß dem Stand der Technik.

Fig. 2: Schematische Darstellung der Herstellung von TGP-Kompositmaterialien mit hoher Spezifität und Selektivität durch Oberflächenfunktionalisierung von speziellen Trägern:

a) Zweischicht-Struktur eines festen, mechanisch stabilen Trägers beliebiger Gestalt: Auf dem Trägermaterial befindet sich eine dünne Polymerschicht, die die unspezifische Bindung von Substanzen am Träger minimiert.

b) Das Reaktionsgemisch für die TGP-Synthese, mit Templat und funktionellem Monomer sowie ggf. Initiator, Vernetzer und Lösungsmittel, wird auf die dünne Polymerschicht aufgebracht und dringt in diese, nicht aber in das Trägermaterial, ein. Dabei kann es für den Komplex aus Templat und funktionellem Monomer im Vergleich zu freiem Monomer und den anderen Komponenten des Reaktionsgemisches zu einer Behinderung durch die dünne Polymerschicht kommen (z.B. "Größenausschlußeffect"), die zu einer Anreicherung von mit Templat komplexiertem funktionellem Monomer an der äußeren Oberfläche

5 des Trägers führen kann. Bei der Kontrollpräparation ohne Templat (und damit ohne Komplex) gibt es diese Effekte nicht.

- c) Eine vernetzende Polymerisation wird selektiv an der Grenzfläche Trägermaterial / dünne Polymerschicht oder/und in der dünnen Polymerschicht initiiert; eine Funktionalisierung findet damit ausschließlich in der dünnen Polymerschicht statt. Die funktionellen Gruppen des komplexierten funktionellen Monomers werden dabei als "Templatabdrücke" vorzugsweise an der äußeren Oberfläche des Trägers fixiert. Bei der Kontrollpräparation ohne Templat gibt es keine Anreicherung von funktionellem Monomer an der äußeren Oberfläche (vgl. b)) und folglich keine spezifische sowie minimale unspezifische Bindung. Das TGP-Kompositmaterial besitzt dagegen eine hohe Bindungsspezifität sowie Selektivität für das Templat (aufgrund der "Templatabdrücke") bei geringer unspezifischer Bindung (aufgrund der Eigenschaften der dünnen Polymerschicht).

Fig. 3: Schematische Darstellung der Anwendungsmöglichkeiten für TGP-Kompositmaterialien mit hoher Spezifität und Selektivität am Beispiel von Membranen für die substanz-spezifische Affinitätstrennung und/oder -analytik

Fig. 4: Terbumetonsorption (aus Wasser) bei der Filtration (vgl. Beispiel 2) für hydrophilierte PVDF-Membranen nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne (Blank) das Templat Terbumeton - Variation des funktionellen Monomers (vgl. Beispiel 1a).

- 5 Fig. 5 Terbumetonsorption (aus Wasser) bei der Filtra-
 tion (vgl. Beispiel 2) für hydrophilierte PVDF-
 Membranen nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne
 (Blank) das Templat Terbumeton - Variation der
10 Konzentration des funktionellen Monomers (vgl.
 Beispiel 1b).
- Fig. 6 Terbumetonsorption (aus Wasser) bei der Filtra-
 tion (vgl. Beispiel 2) für hydrophilierte PVDF-
 Membranen nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne
15 (Blank) das Templat Terbumeton - Variation der
 Konzentration des Vernetzers (vgl. Beispiel 1c).
- Fig. 7 Herbizid-Sorption (aus Wasser) bei der Filtration
 (vgl. Beispiel 2) für hydrophilierte PVDF-
20 Membranen nach Synthesen mit (TGP) bzw. ohne
 (Blank) das Templat Terbumeton - Variation des
 funktionellen Monomers (vgl. Beispiel 1a).

5 **Abkürzungsverzeichnis**

	AA	Acrylsäure
	AMPS	2-Acryloylamino-propan-2-sulfonsäure
10	BET	Brunauer-Emmet-Teller; Methode zur Messung von Adsorptionsisothermen für die Bestimmung spezifischer Oberflächen von Festkörpern
	BP	Benzophenon
	DG	Modifizierungsgrad
	ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
15	FTIR-ATR	Fourier Transform Infrared-Attenuation of Total Reflexion; (Infrarotspektroskopie mit Abschwächung der Totalreflexion)
	GC	Gaschromatographie
20	LM	Lösungsmittel
	M	mol/l; Konzentration
	MAA	Methacrylsäure
	MBAA	N,N'-Methylenbisacrylamid
	mM	mol/l; Konzentration
25	MTP	Mikrotiterplatte
	MP	Mikropartikel
	n	Stoffmenge
	POD	Peroxidase
	PP	Polypropylen
30	PVDF	Polyvinylidenfluorid
	REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
	TGP	Templat-geprägte Polymere
	UV	Ultraviolett

5

Patentansprüche

10

1. Verfahren zur Herstellung eines Templat-geprägten Materials durch Synthese eines Templat-geprägten Polymers (TGP) über vernetzende Polymerisation funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templates auf einem Träger, dadurch gekennzeichnet, daß

15

20

ein Träger, der auf der Oberfläche eine dünne Polymerschicht aufweist, mit dem Reaktionsgemisch, bestehend aus Polymerisationsinitiator, Templat, funktionellem Monomer, Vernetzer, Lösungsmittel und/oder Puffer versetzt wird, nach Sorption des Reaktionsgemisches in der dünnen Polymerschicht die Polymerisation gestartet und bis zum Erreichen der Aufnahmekapazität der dünnen Polymerschicht für das Templat-geprägte Polymer geführt wird, und das Templat in einem letzten Schritt gegebenenfalls entfernt wird, wobei der eingesetzte Träger so gewählt wird, daß er die Reaktionslösung nicht aufnehmen kann.

25

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

30

das Reaktionsgemisch zugegeben wird, indem zunächst die Hauptmenge des Polymerisationsinitiators in einem Lösungsmittel zugesetzt wird und anschließend das Reaktionsgemisch aus Restmenge des Initiators, Templat, funktionellem Monomer, Vernetzer, Lösungsmittel und/oder Puffer zugesetzt wird.

35

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

5 das Reaktionsgemisch zugegeben wird, indem zunächst der gesamte Polymerisationsinitiator in einem Lösungsmittel zugesetzt wird und anschließend das restliche Reaktionsgemisch aus Templat, funktionellem Monomer, Vernetzer, Lösungsmittel und/oder Puffer zugesetzt wird.

10 4. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

15 als Träger ein Formkörper aus einem hydrophoben Material eingesetzt wird und als dünne Polymerschicht eine Schicht aus einem hydrophilen Polymer dient.

5. Verfahren nach Anspruch 1,

20 dadurch gekennzeichnet, daß

als Träger ein anorganischer Festkörper eingesetzt wird und als dünne Polymerschicht eine Schicht aus einem hydrophilen oder hydrophoben Polymer dient.

25 6. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

30 als Träger ein Formkörper aus einem stark vernetzten organischen Polymer eingesetzt wird und als dünne Polymerschicht eine Schicht aus einem hydrophilen oder hydrophoben Polymer dient.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4, 5 oder 6,

35 dadurch gekennzeichnet, daß

als Träger Filme, Folien, Platten, insbesondere Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäße jeglicher Formen, Parti-

5 kel, insbesondere Mikro- oder Nanopartikel, Fasern,
insbesondere Hohlfasern, Gewebe, Vliese, Filter oder
Membranen aus anorganischen oder organischen Materia-
lien eingesetzt werden.

10 8. Verfahren nach Anspruch 4,

dadurch gekennzeichnet, daß

als hydrophobe Trägermaterialien hydrophobe organische
Polymere eingesetzt werden, vorzugsweise Polypropylen,
15 Polyethylen, Polystyren, Polysulfon, hydrophobe Poly-
amide, hydrophobe Polyester, Polycarbonat, Polyacryl-
nitril, Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluoroethylen,
hydrophobe Polyacrylate, sowie deren Derivate, Copoly-
mere oder auch Blends dieser Polymere.

20 9. Verfahren nach Anspruch 5,

dadurch gekennzeichnet, daß

als anorganische Festkörper Gläser, Silikate, Keramiken
25 oder Metalle bzw. deren Komposite, auch mit hydrophoben
oder vernetzten organischen Polymeren, eingesetzt wer-
den.

30 10. Verfahren nach Anspruch 6,

dadurch gekennzeichnet, daß

als stark vernetztes organisches Polymer stark vernetz-
tes Polystyrol sowie Polystyrol-derivate- oder copoly-
mere, oder stark vernetzte Polyacrylate eingesetzt wer-
35 den.

5 11. Verfahren nach Anspruch 7,

dadurch gekennzeichnet, daß

als Träger eine poröse Membran mit Porengrößen zwischen
2 nm und 10 μm , bevorzugt 100 nm bis 5 μm , eingesetzt
wird.

10 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 4, 5 oder 6,

dadurch gekennzeichnet, daß

15 als dünne hydrophile Polymerschicht eine Schicht aus
vernetzten oder unvernetzten hydrophilen Polyacrylaten,
Polyacrylamiden, Cellulose, Amylose, Agarose sowie de-
ren Derivaten, Copolymeren oder Blends dient, insbeson-
dere aus 2-Hydroxypropylmethacrylat, das mit
Tetraethylenglycolbismethacrylat vernetzt wurde.

20 13. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,

dadurch gekennzeichnet, daß

25 als dünne hydrophobe Polymerschicht eine Schicht aus
vernetzten oder unvernetzten fluorierten Polymeren, Si-
liconen, Paraffinen oder Wachsen sowie deren Derivaten,
Copolymeren oder Blends dient.

30 14. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Dicke der Polymerschicht auf dem Träger von 1 nm
bis 1 μm beträgt, vorzugsweise ca. 5 bis 20 nm.

5 15. Verfahren nach Anspruch 4,

dadurch gekennzeichnet, daß

als hydrophober Träger, der auf der Oberfläche eine dünne hydrophile Polymerschicht aufweist, eine hydrophilierte Polyvinylidenfluorid-Membran eingesetzt wird.

10 16. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

15 die Polymerisation als eine photoinitiierte vernetzende Pfropfcopolymerisation der funktionellen Monomere mit einer Substanz vom H-Abstraktionstyp als Photoinitiator und mit der dünnen Polymerschicht als Coinitiator durchgeführt wird.

20 17. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

25 als Template kleine Moleküle mit Molekülmassen bis zu 100 Da, größere Moleküle bis zu 1.000.000 Da oder auch Mikroorganismen oder Zellen eingesetzt werden.

18. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

30 als funktionelle Monomere polymerisationsfähige Verbindungen mit zur Wechselwirkung mit Templaten befähigten Gruppen, insbesondere Carboxyl-, Sulfonyl-, Sulfat-, Phosphat-, Amino- oder quartären Ammonium-Gruppen, oder deren Derivate, auch im Gemisch, eingesetzt werden, 35 vorzugsweise AMPS, MAA oder AA.

- 5 19. Templat-geprägtes Material hergestellt nach dem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 18.
- 10 20. Verwendung des Templat-geprägten Materials nach Anspruch 19 in der Stofftrennung oder Analytik von flüssigen oder gasförmigen Stoffgemischen, die auf der spezifischen Bindung des Templates oder eines Templatderivates am TGP bei der Perfusion oder Diffusion durch das Templat-geprägte Material oder der Applikation auf
15 das Templat-geprägte Material basieren.
- 20 21. Verwendung nach Anspruch 20 zur substanzspezifischen Stofftrennung mittels Affinitätsfiltration mit einem TGP-Material nach Anspruch 19 zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung, Freisetzung oder analytischen Bestimmung von Substanzen.
- 25 22. Verwendung nach Anspruch 20 zur substanzspezifischen Stofftrennung mittels Dialyse oder Elektrodialyse durch ein TGP-Material nach Anspruch 19 zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung, Abgabe oder analytischen Bestimmung von Substanzen.
30
- 35 23. Verwendung nach Anspruch 20 zur substanzspezifischen Stofftrennung mittels Festphasenextraktion, Chromatographie, Membranchromatographie, Elektrophorese oder kontrollierter Freisetzung aus einem Reservoir mit einem TGP-Material nach Anspruch 19 zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung, Abgabe oder analytischen Bestimmung von Substanzen.

5 24. Verwendung nach Anspruch 20 zur substanzspezifischen
Stofftrennung und/oder Bindung und/oder chemischen Um-
wandlung durch ein TGP-Material nach Anspruch 19 als
Sensor oder Katalysator zur Reinigung, Abtrennung oder
analytischen Bestimmung von Substanzen.

10

15 25. Verwendung nach Anspruch 20 zur substanzspezifischen
Stofftrennung und/oder Bindung und/oder chemischen Um-
wandlung durch ein TGP-Material nach Anspruch 19 als
Blottingmembran, Teststreifen oder Träger, vorzugsweise
als Reaktionsgefäß, Mikrotiterplatte oder Partikel für
qualitative oder quantitative Assays oder zum Wirk-
stoff-Screening.

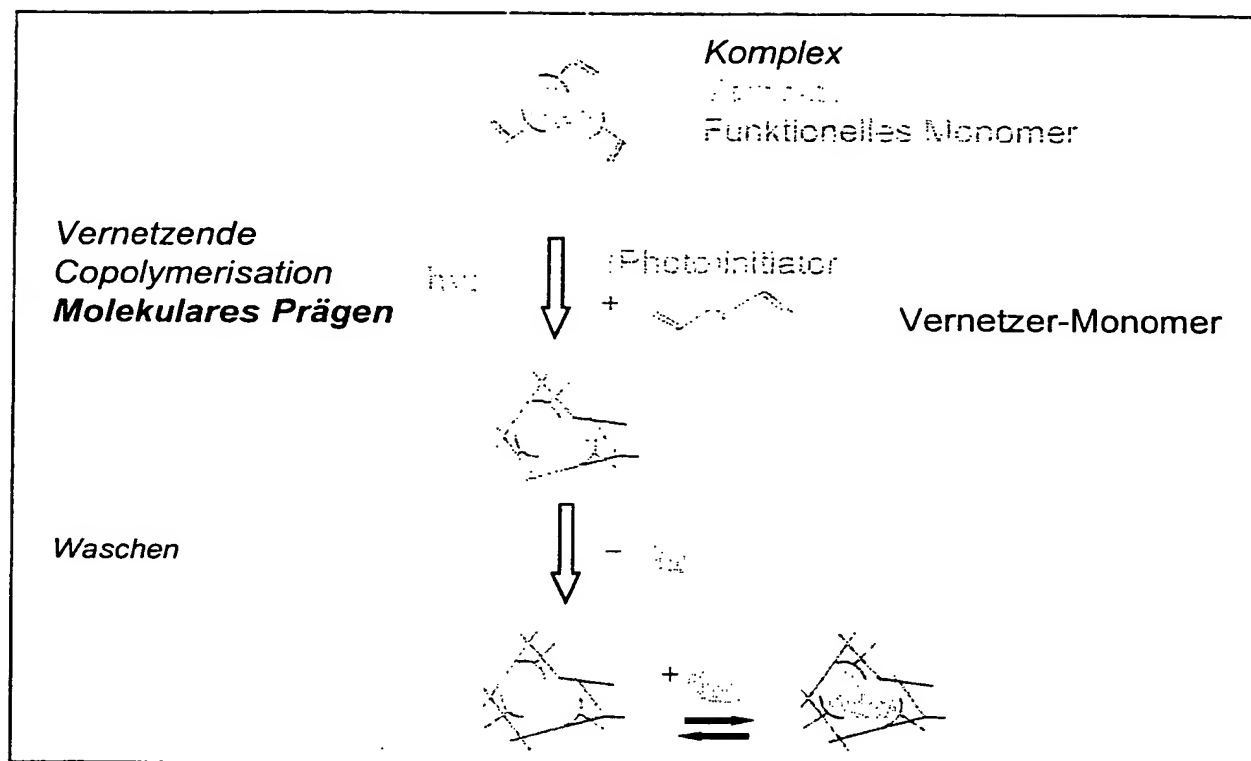


Fig. 1:

2/7

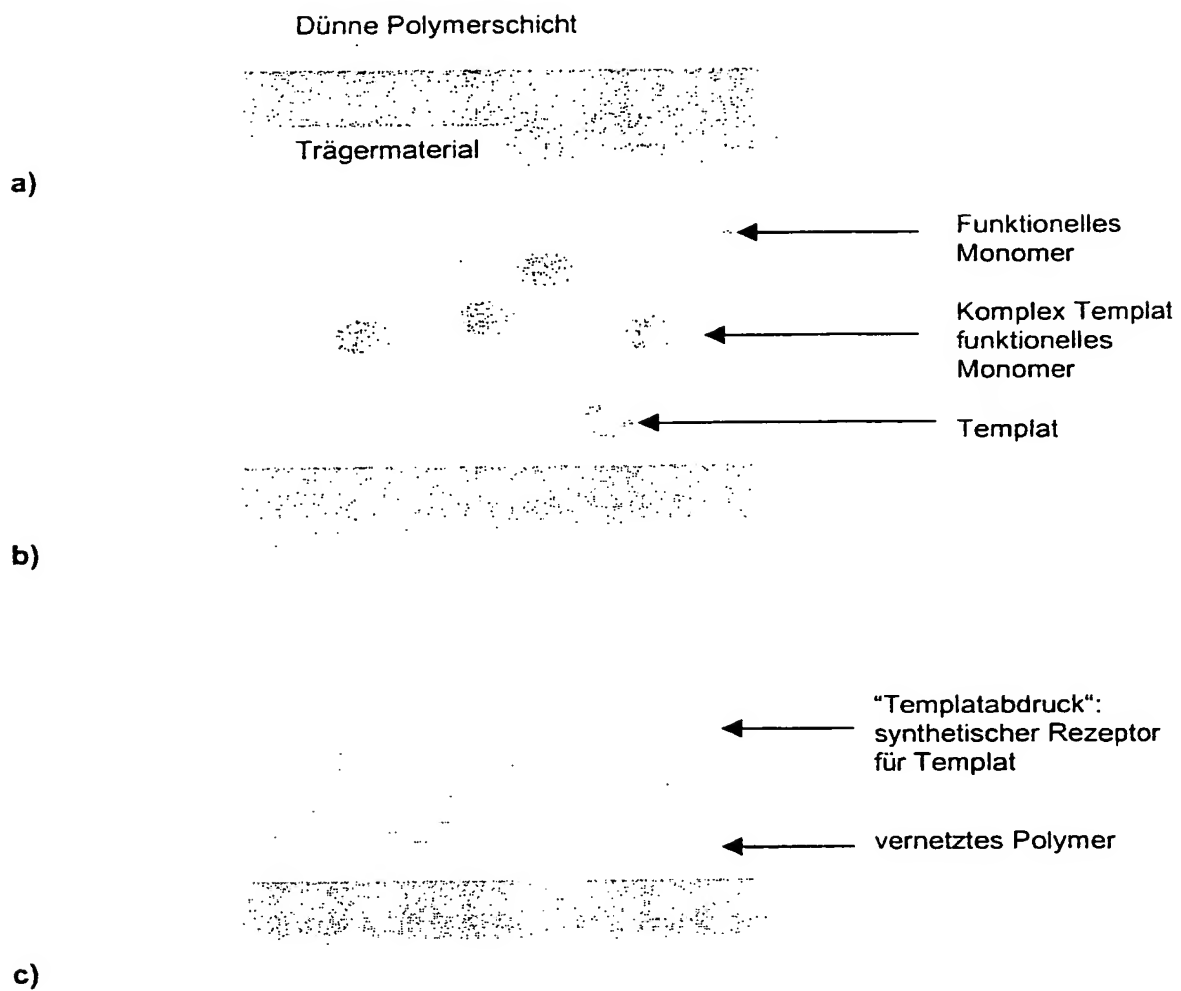


Fig. 2

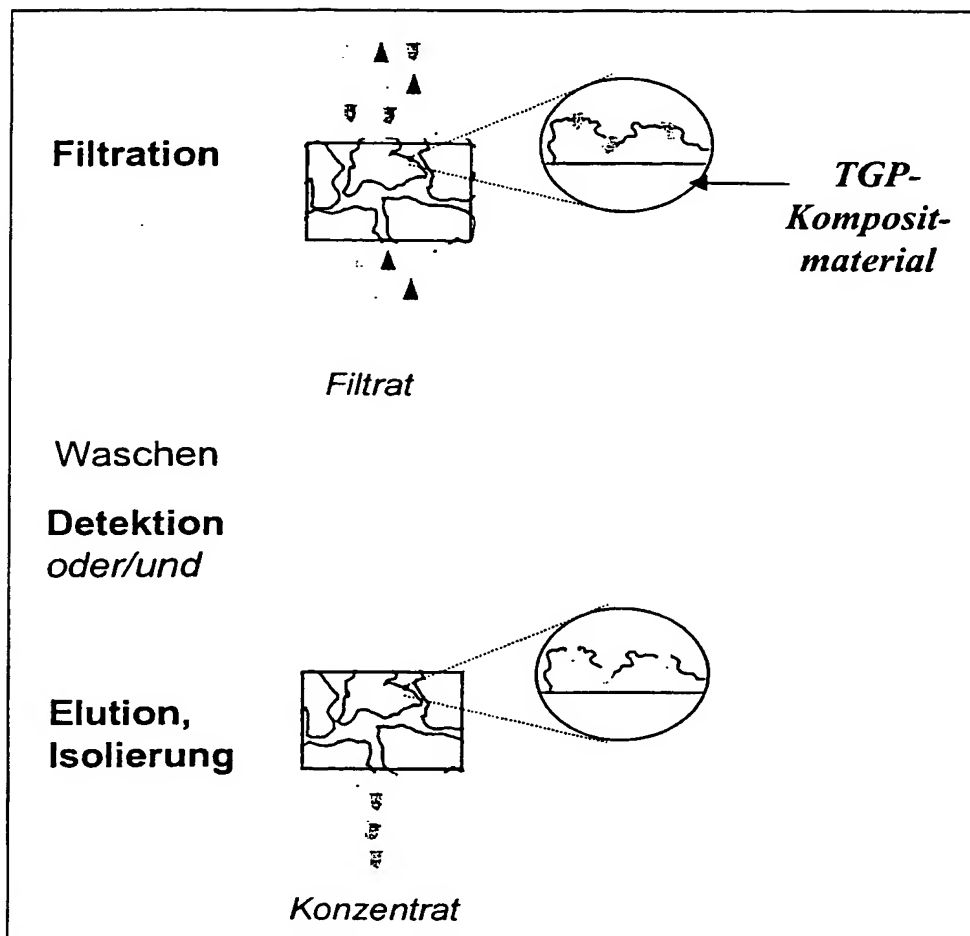


Fig. 3

4/7

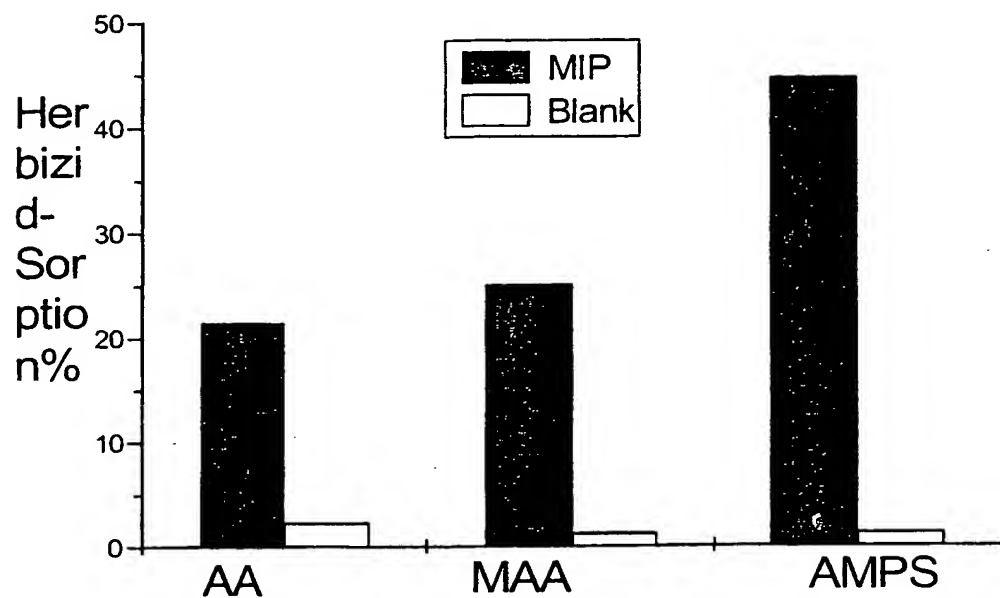


Fig. 4

5/7

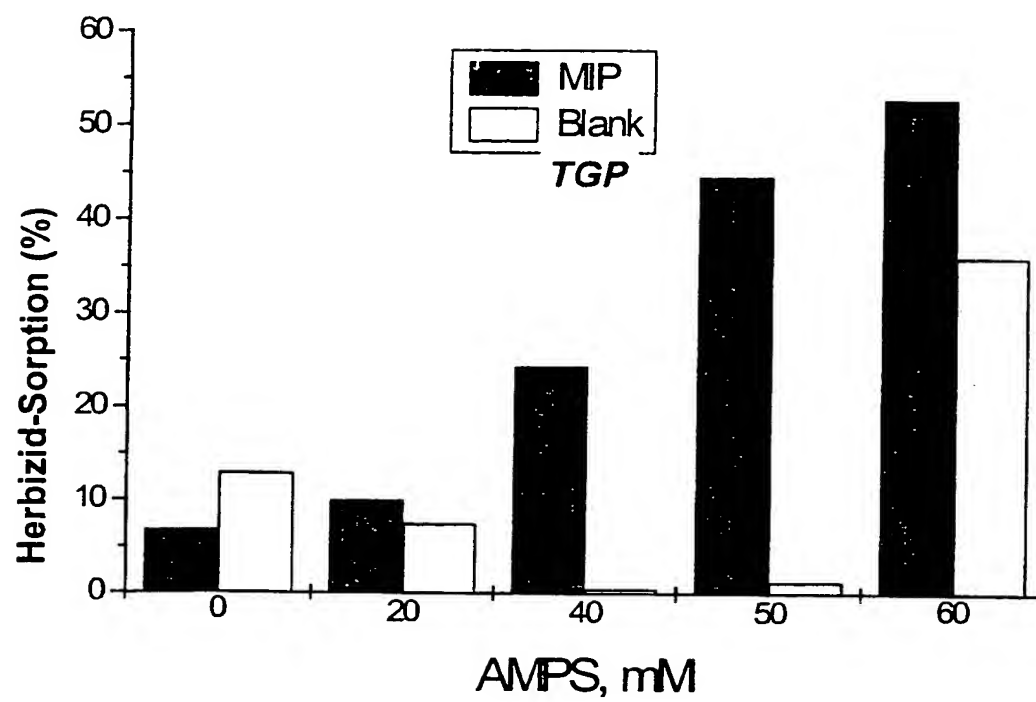


Fig. 5

6/7

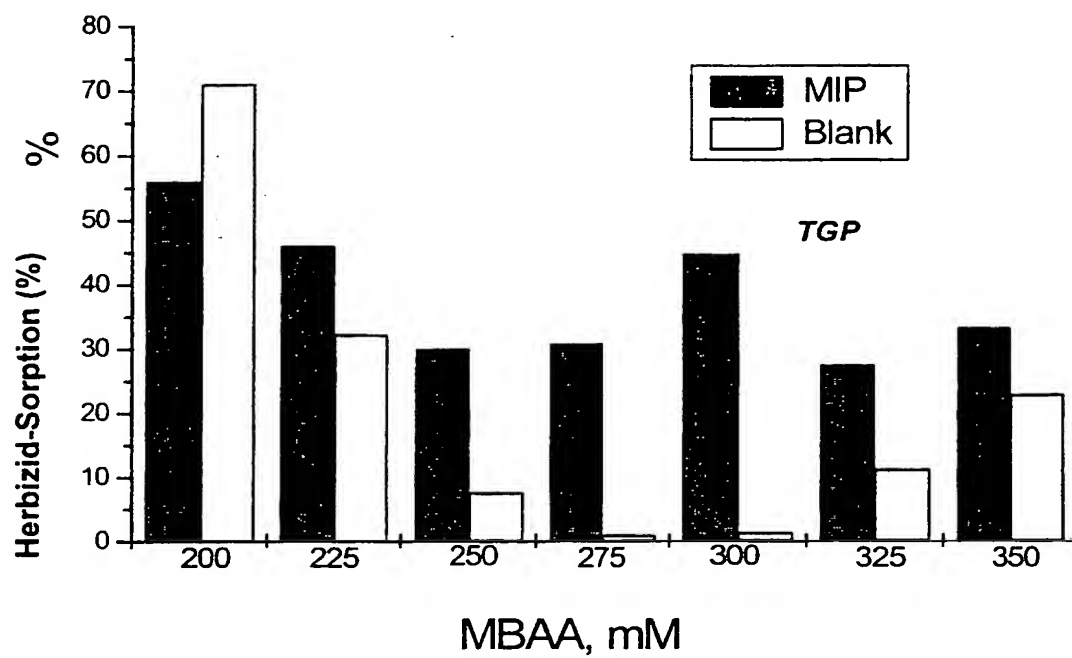


Fig. 6

7/7

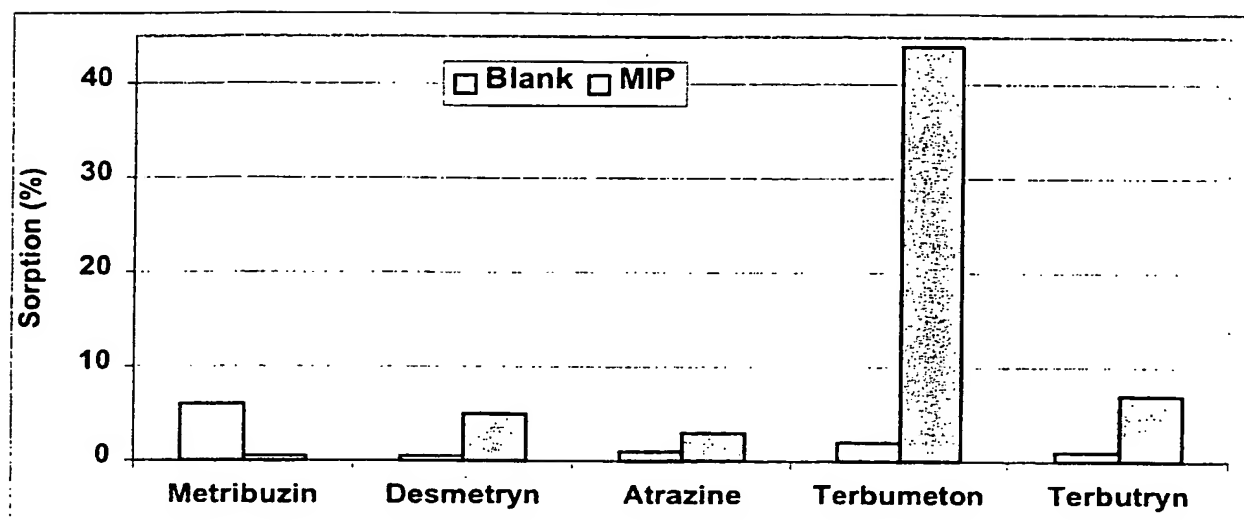


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/12095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01J20/32 G01N30/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 19886 A (B.SELLERGREN ET AL.) 22 March 2001 (2001-03-22) the whole document	1-25
P,A	WO 00 07702 A (M.ULBRICHT ET AL.) 17 February 2000 (2000-02-17) the whole document	1
A	US 5 372 719 A (N.B.AFEYAN ET AL.) 13 December 1994 (1994-12-13) cited in the application the whole document	1-25
A	US 4 618 533 A (M.J.STEUCK) 21 October 1986 (1986-10-21) cited in the application the whole document	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 May 2001

Date of mailing of the international search report

16/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bertram, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/12095

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 786 428 A (F.H.ARNOLD ET AL.) 28 July 1998 (1998-07-28) claims 1-23; examples 1,2 ---	1
A	WO 94 16319 A (K.NILSSON ET AL.) 21 July 1994 (1994-07-21) the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/12095

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0119886	A	22-03-2001	NONE	
WO 0007702	A	17-02-2000	DE 19936992 A	25-05-2000
US 5372719	A	13-12-1994	AU 663184 B AU 3928493 A CA 2132987 A EP 0633811 A JP 7505335 T WO 9319844 A US 5453199 A US 5641539 A	28-09-1995 08-11-1993 14-10-1993 18-01-1995 15-06-1995 14-10-1993 26-09-1995 24-06-1997
US 4618533	A	21-10-1986	DE 3581520 D EP 0186758 A JP 2506611 B JP 7051550 A JP 1933936 C JP 4075051 B JP 61133102 A	28-02-1991 09-07-1986 12-06-1996 28-02-1995 26-05-1995 27-11-1992 20-06-1986
US 5786428	A	28-07-1998	NONE	
WO 9416319	A	21-07-1994	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01J20/32 G01N30/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 B01J G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	WO 01 19886 A (B.SELLERGREN ET AL.) 22. März 2001 (2001-03-22) das ganze Dokument ---	1-25
P,A	WO 00 07702 A (M.ULBRICHT ET AL.) 17. Februar 2000 (2000-02-17) das ganze Dokument ---	1
A	US 5 372 719 A (N.B.AFEYAN ET AL.) 13. Dezember 1994 (1994-12-13) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-25
A	US 4 618 533 A (M.J.STEUCK) 21. Oktober 1986 (1986-10-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bertram, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 786 428 A (F.H.ARNOLD ET AL.) 28. Juli 1998 (1998-07-28) Ansprüche 1-23; Beispiele 1,2 ---	1
A	WO 94 16319 A (K.NILSSON ET AL.) 21. Juli 1994 (1994-07-21) das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/12095

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0119886	A	22-03-2001	KEINE		
WO 0007702	A	17-02-2000	DE	19936992 A	25-05-2000
US 5372719	A	13-12-1994	AU	663184 B	28-09-1995
			AU	3928493 A	08-11-1993
			CA	2132987 A	14-10-1993
			EP	0633811 A	18-01-1995
			JP	7505335 T	15-06-1995
			WO	9319844 A	14-10-1993
			US	5453199 A	26-09-1995
			US	5641539 A	24-06-1997
US 4618533	A	21-10-1986	DE	3581520 D	28-02-1991
			EP	0186758 A	09-07-1986
			JP	2506611 B	12-06-1996
			JP	7051550 A	28-02-1995
			JP	1933936 C	26-05-1995
			JP	4075051 B	27-11-1992
			JP	61133102 A	20-06-1986
US 5786428	A	28-07-1998	KEINE		
WO 9416319	A	21-07-1994	KEINE		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.